

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie,
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger

***In vitro* und *in vivo* Analyse von Mono- und Ko-Kultur-Sphäroiden
zur potentiellen Anwendung im Knochen-Tissue Engineering**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

Vorgelegt von: Regina Walser
geb. am 05.04.1987 in Isny im Allgäu

Meinen Eltern

&

einer möglichen
Zukunft

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. SUMMARY	2
3. EINLEITUNG	3
4. ZIEL DER ARBEIT	9
5. MATERIAL UND METHODEN	10
5.1 ZELLKULTUR	10
5.2 HERSTELLUNG VON SPHÄROIDEN	11
5.3 HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER SPHÄROIDE.....	11
5.3.1 <i>Einbetten der Sphäroide und Anfertigung histologischer Schnitte</i>	11
5.3.2 <i>Histologie</i>	12
5.3.3 <i>Immunhistochemie</i>	12
5.3.3.1 Apoptose	13
5.3.3.2 Vaskularisierung	14
5.4 <i>IN VIVO</i> ANALYSE DER SPHÄROIDE IN DER RÜCKENHAUTKAMMER.....	14
5.4.1 <i>Versuchstiere</i>	14
5.4.2 <i>Rückenhautkammer</i>	15
5.4.3 <i>Transplantation der Sphäroide</i>	18
5.4.4 <i>Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen</i>	18
5.4.5 <i>Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</i>	18
5.4.5.1 Aufbau des intravitalen Fluoreszenzmikroskops	18
5.4.5.2 Ablauf der Fluoreszenzmikroskopie.....	21
5.4.5.3 Analysierte Parameter.....	21
5.4.6 <i>Histologie und Immunhistochemie</i>	23
5.4.6.1 Apoptose	23
5.4.6.2 Vaskularisierung	23
5.5 VERSUCHSPROTOKOLL	24
5.6 STATISTIK.....	25

6. ERGEBNISSE	26
6.1 ZELLULÄRE ORGANISATION UND APOPTOTISCHER ZELLTOD FRISCH GENERIERTER SPHÄROIDE	26
6.2 MIKROZIRKULATION DER RÜCKENHAUTKAMMER	28
6.3 GRÖÖE UND APOPTOTISCHER ZELLTOD TRANSPLANTierter SPHÄROIDE	30
6.4 VASKULARISIERUNG TRANSPLANTierter SPHÄROIDE	33
6.5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	37
 7. DISKUSSION	 38
7.1 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN	38
7.1.1 <i>Diskussion des Modells</i>	38
7.1.2 <i>Diskussion der Methoden</i>	39
7.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	41
7.3 SCHLUSSFOLGERUNG	44
 8. LITERATURVERZEICHNIS.....	 45
 9. DANKSAGUNG.....	 55
 10. LEBENSLAUF.....	 FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
 11. PUBLIKATIONEN	 56
11.1 ORIGINALARBEITEN.....	56
11.2 VORTRÄGE/ABSTRACTS.....	56

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP	bone morphogenetic protein
ca.	circa
CCD	charge-coupled device
CD31	cluster of differentiation 31
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSD	critical size defect
d	day
DAB	Diaminobenzidin
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DVD	digital versatile disc
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
HCl	Salzsäure
HDMEC	human dermal microvascular endothelial cells
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	hypoxia inducible factor-1 α
HOB	human osteoblasts
HPF	high power field
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
M.	Musculus
Mm.	Musculi
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NHDF	normal human dermal fibroblasts
PBS	phosphate buffered saline
SEM	Standardfehler des Mittelwerts

SMC	smooth muscle cells
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
W	Watt

1. Zusammenfassung

Im klinischen Alltag werden zur Therapie von Knochendefekten autologe, allogene und künstliche Knochenersatzmaterialien verwendet. Die Verwendung von künstlichen Materialien ist auf Grund der begrenzten Verfügbarkeit autologer und allogener Materialien insbesondere bei der Therapie von großen Knochendefekten angezeigt. Nachteile künstlicher Knochenersatzmaterialien sind jedoch ihre mangelnde Osteokonduktion, Osteoinduktion, Osteogenese und Vaskularisierung nach Implantation. Aus diesem Grund wird im Bereich des Tissue Engineerings nach besseren Verfahren zur Knochenherstellung gesucht. Zell-Sphäroide stellen aussichtsreiche Baueinheiten für das Tissue Engineering von Knochen dar. Zum einen ermöglicht die dreidimensionale Organisation der Zellen innerhalb der Sphäroide intensive direkte Zell-Zell-Kontakte. Zum anderen können durch Ko-Kultivierung in Sphäroiden verschiedene geweberrelevante Zelltypen kombiniert werden.

Ziel dieser Studie war es, *in vitro* und *in vivo* das angiogene Potential von Mono- und Ko-Kultur-Sphäroiden zu untersuchen, welche zukünftig die Angio- und Osseointegration künstlicher Knochenersatzmaterialien verbessern könnten. Hierfür wurden mittels der Liquid-Overlay-Methode Ko-Kultur-Sphäroide mit unterschiedlicher Zusammensetzung aus humanen Osteoblasten (HOB), humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und normalen humanen Fibroblasten (NHDF) hergestellt. Mono-Kultur-Sphäroide aus HOB oder HDMEC dienten als Kontrollen. Nach 72 h Kultivierungszeit wurde immunhistochemisch der apoptotische Zelltod und die Dichte humaner Gefäße in den Sphäroiden analysiert. Weiterhin wurden die Sphäroide in die Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen transplantiert, um *in vivo* ihre Überlebensfähigkeit und Vaskularisierung innerhalb einer zweiwöchigen Beobachtungszeit mittels repetitiver intravitaler Fluoreszenzmikroskopie und Immunhistochemie zu untersuchen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass nach 72 h Kultivierungszeit HDMEC-enhaltende Ko-Kultur-Sphäroide *in vitro* ein dichtes tubuläres, Gefäß-ähnliches Netzwerk formen und sich durch eine signifikant geringere Anzahl an apoptotischen Zellen im Vergleich zu HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroiden auszeichnen. Nach Transplantation in die Rückenhautkammer können sich diese Netzwerke mit dem murinen Empfängergefäßsystem über Inoskulation verbinden. Interessanterweise ist dieser Prozess bei HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroiden am stärksten ausgeprägt und kann durch Zusatz von NHDF nicht weiter verbessert werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroide vielversprechende funktionelle Vaskularisierungseinheiten darstellen, welche zukünftig in Scaffolds für das Knochen-Tissue Engineering integriert oder direkt in nicht-heilende große Knochendefekte transplantiert werden könnten.

2. Summary

Currently, autologous, allogeneic and artificial bone grafts are used in clinical practice for the therapy of bone defects. Critical size defects (CSD) are primarily used for artificial bone grafts. Because of the limited bioavailability of autologous and allogeneic bone grafts. Disadvantages of artificial bone grafts are their lack of stimulatory actions on osteoconduction, osteoinduction, osteogenesis and vascularization after implantation. For this reason, there is an urgent need for improved approaches in the field of bone tissue engineering. Cell spheroids represent attractive units for the tissue engineering of bone, because they provide a three-dimensional environment with intensive direct cell-cell contacts. Moreover, they allow for co-culture of both osteoblasts and vessel-forming cells, which may markedly increase their survival and vascularization after transplantation.

The aim of this study was to examine the *in vitro* and *in vivo* vascularization capacity of mono- and co-culture spheroids which may be used in the future to improve angio- and osseointegration of artificial bone grafts. Co-culture spheroids were generated by aggregating different combinations of primary human osteoblasts (HOB), human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) and normal human dermal fibroblasts (NHDF) using the liquid overlay technique. Mono-culture spheroids consisting either of HOB or HDMEC served as controls. 72 h after cultivation, apoptotic cells and the density of human blood vessels within the spheroids were immunohistochemically analyzed. In addition, the different spheroids were transplanted into dorsal skinfold chambers of CD1 Nu/Nu mice to study *in vivo* their viability and vascularization over a 2-week observation period by means of repetitive intravital fluorescence microscopy and immunohistochemistry.

The results of this study show that *in vitro* co-culture spheroids containing HDMEC rapidly form dense tubular vessel-like networks within 72 h and exhibit a significantly lower rate of apoptotic cell death when compared to mono-culture HDMEC spheroids. After transplantation, these vascular networks interconnect to the host microvasculature by inosculation. Of interest, this process is most pronounced in HOB-HDMEC spheroids and can not be further improved by the addition of NHDF.

In summary, the findings of this study indicate that HOB-HDMEC spheroids exhibit excellent properties to preserve cell viability and to promote cell proliferation and vascularization. Therefore, they may be used as functional vascularization units for the seeding of scaffolds or for the vitalization of non-healing large bone defects.

3. Einleitung

Die Rekonstruktion großer Knochendefekte ist eine Herausforderung in der Traumatologie. Ein Knochendefekt kritischer Größe (critical size defect, CSD) liegt dann vor, wenn ohne zusätzliche Maßnahmen keine komplette, spontane Regeneration des Knochendefektes erfolgt [Schmitz und Hollinger, 1986; Hollinger und Kleinschmidt, 1990]. Risikofaktoren für eine ungenügende Knochenheilung sind instabile Frakturen, mangelnde Vaskularisierung, Größe des Defekts, Ko-Morbidität und hohes Alter des Patienten [Rose und Oreffo, 2002; Bishop et al., 2012]. Bei einem CSD ist die Implantation von Knochenersatzmaterialien eine therapeutische Möglichkeit, um die Heilung zu fördern.

Laurencin et al. [2006] beschreiben die Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien, welche für eine erfolgreiche Transplantation mit nachfolgender vitaler Knochenintegration wichtig sind:

- Osteokonduktion als Fähigkeit, ein Gerüst zur Verfügung zu stellen, welches Knochen und Blutgefäßen als Leitstruktur dient
- Osteoinduktion als Fähigkeit, Stammzellen oder unreife Osteoblasten zur Proliferation anzuregen oder diese zu osteogenen Zellen zu differenzieren
- Osteogenese als Fähigkeit, neuen Knochen zu bilden

Im klinischen Alltag kommen autologe, allogene und künstliche Knochenersatzmaterialien zur Anwendung. Aktuell ist auf Grund seiner osteokonduktiven, osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften die Transplantation von frisch isoliertem autologen Knochen der therapeutische Goldstandard [Laurencin et al., 2006; Nandi et al., 2010]. Für eine autologe Knochentransplantation stehen verschiedene Entnahmestellen zur Verfügung. Beispielsweise kann der Knochen aus dem Beckenkamm entnommen werden. Obwohl dabei die Entnahmestelle in den meisten Fällen ohne Komplikationen verheilt, handelt es sich um einen weiteren, für den Patienten belastenden Eingriff mit entsprechenden Risiken und einer nicht unerheblichen, zusätzlichen Ko-Morbidität [Bishop et al., 2012]. Ein weiterer Nachteil ist die limitierte Verfügbarkeit autologen Knochenmaterials [Salgado et al., 2004].

Alternativ lässt sich allogenes Knochenmaterial, welches von Lebendspendern [Flören et al., 2007] oder Leichen gewonnen wird, verwenden. Nachteile sind hierbei eine mögliche Aktivierung des Immunsystems gegen das körperfremde Material [Friedlaender, 1983; Friedlaender und Horowitz, 1992] und die potentielle Gefahr der Infektion [Simonds et al., 1992; Conrad et al., 1995]. Durch spezielle Konservierungsverfahren wie Trocknung, Kälte und Sterilisation lässt sich die Wahrscheinlichkeit einer Immunreaktion minimieren [Giannoudis et al., 2005]. Jedoch wird durch diese Aufbereitung in allogenen Materialien der

Gehalt an bioaktiven Substanzen und Wachstumsfaktoren reduziert, was eine geringere Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteogenese im Vergleich zu autologen Materialien zur Folge hat [Hallfeldt et al., 1992; Hallfeldt et al., 1995; Nandi et al., 2010].

Neben autologen und allogenen Materialien stehen als dritte Möglichkeit der Knochendefektfüllung künstliche Materialien zur Verfügung. Ein großes Problem synthetischer Materialien ist ihre unzureichende Vaskularisierung nach Implantation, die für eine adäquate Ossifikation eine wesentliche Voraussetzung ist [Street et al, 2002; Steffens et al., 2009]. Für jedes Gewebe sind Nährstoffe und der Abtransport von Stoffwechselendprodukten über den Blutweg überlebensnotwendig. Die unzureichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen kann zur Nekrose und unvollständigen Integration des Transplantats führen [Rouwkema et al., 2008]. Eine Sauerstoffversorgung lediglich über Diffusion ist nur über eine Distanz von ca. 150-200 µm zur nächsten Kapillare möglich [Folkman und Hochberg, 1973; Laschke et al., 2008b]. Seit Mitte der 1980er Jahre wird daher im Bereich des Tissue Engineerings nach möglichen Lösungen zur Verbesserung der Vaskularisierung gesucht.

Als übergeordneter Begriff beschreibt Tissue Engineering die künstliche Herstellung eines Gewebeersatzes. Dabei werden Grundprinzipien aus Technik und Wissenschaft vereint [Langer und Vacanti, 1993]. Ziele des Tissue Engineerings sind entweder durch biologisch verträgliche, im Labor vorgefertigte Ersatzstoffe fehlendes Gewebe zu ersetzen, geschädigtem Gewebe bei der Wiederherstellung zu helfen oder die Gewebefunktion zu verbessern [Langer und Vacanti, 1993]. Im Wesentlichen benötigt man für das klassische Tissue Engineering: a) vitale Zellen oder Gewebe, b) ein strukturelles Gerüst und ggf. zusätzlich c) Wachstumsfaktoren zur Stimulation der Angiogenese, wie z. B. vascular endothelial growth factor (VEGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF), oder der Osteogenese, wie z. B. bone morphogenetic protein (BMP) [Nemeno-Guanzon et al., 2012]. Ein strukturelles Gerüst oder Trägermaterial ist eine dreidimensionale Matrix, welche als Leitstruktur für Zellen und Wachstumsfaktoren dient [Bruder und Fox, 1999]. Häufig wird hierfür ein Scaffold verwendet, welches mit Zellen oder Zellkonstrukten, wie z. B. Sphäroiden, besiedelt werden kann. Scaffolds sind vielseitig einsetzbar, leicht herzustellen und einfach in das Gewebe zu implantieren. Moderne Trägermaterialien sind biologisch abbaubar und können zudem Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren freisetzen [Agrawal und Ray, 2001; Muschler und Midura, 2002; Tripathi et al., 2012]. Ein Nachteil ist eine langsame Vaskularisierung über das Einwachsen von Blutgefäßen des Empfängergewebes aus der Peripherie in das Implantat [Rouwkema et al., 2008].

Auf Grund einer gesteigerten Nachfrage nach Knochenersatzmaterialien im klinischen Alltag hat das Tissue Engineering von Knochen in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Dies lässt sich durch die demographische Entwicklung und die

Zunahme von Volkskrankheiten wie Adipositas erklären, welche die Häufigkeit von Knochenfehlbildungen und -erkrankungen erhöhen [Amini et al., 2012]. Daher ist auch eine Zunahme an CSDs im klinischen Alltag absehbar. Für die Herstellung von funktionsfähigem Ersatzknochen mittels Tissue Engineering sollten möglichst die physiologischen Komponenten des Knochens imitiert werden [Amini et al., 2012]. Dieser ist aus regenerationsfähigen Zellen, extrazellulärer Matrix und knochenspezifischen Proteinen, wie z. B. Osteocalcin und Osteopontin, aufgebaut.

Als osteogene Zellen werden unter anderem mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen und ausdifferenzierte Osteoblasten verwendet [Jadlowiec et al., 2003]. Im Gegensatz zu ausdifferenzierten Zellen können Stammzellen sich in unterschiedliche Zelltypen differenzieren [Rose und Oreffo, 2002].

Wachstumsfaktoren dienen als Signalmoleküle in der Zellkommunikation und sind Zytokine, welche von Zellen synthetisiert werden. Sie können z. B. an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und auf diese Art und Weise intrazelluläre Signalmechanismen via humoraler oder direkter Signalübertragung auslösen [Salgado et al., 2004]. Die Zelle kann daraufhin ihr Migrations-, Proliferations-, Adhäsions- und Differenzierungsverhalten verändern [Rose und Oreffo, 2002; Oreffo, 2004]. Interessanterweise können auch osteogene Wachstumsfaktoren, wie z. B. BMP-2 und -4 oder fibroblast growth factor (FGF), entweder direkt oder indirekt durch Produktion von angiogenen Wachstumsfaktoren *in vivo* die Angiogenese stimulieren [Carano und Filvaroff, 2003].

Angiogenese ist definiert als die Bildung neuer Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen [Risau, 1997]. Sie stellt einen komplexen dynamischen Prozess dar, welcher durch parakrine und zelluläre Interaktionen charakterisiert ist [Carmeliet, 2000]. Anfangs werden vaskuläre Endothelzellen aktiviert, was in einer Vasodilatation resultiert. Durch Abbau der Basalmembran über Expression und Freisetzung von Matrix-Metalloproteasen erhöht sich die vaskuläre Permeabilität [Carmeliet, 2000]. Hierdurch können Endothelzellen in das Interstitium wandern, so dass Kapillarknospen und Sprouts gebildet werden. Um diese neu geformten Blutgefäße zu stabilisieren, werden weitere Zelltypen, wie z. B. glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMC), Perizyten und Fibroblasten, und Bestandteile der extrazellulären Matrix benötigt [Laschke et al., 2006]. Dies wird durch die Interaktion verschiedener Wachstumsfaktoren eng reguliert [Patan, 2004].

Einer der wichtigsten angiogenen Wachstumsfaktoren ist VEGF. Dieser ist in der Lage, die Angiogenese zu stimulieren und kann die Aktivität und das Überleben von Endothelzellen, Osteoblasten und Osteoklasten regulieren [Nakagawa et al., 2000; Ferrara et al., 2003; Street et al., 2002]. VEGF erhöht die vaskuläre Permeabilität, was vor allem zu Beginn der Angiogenese wichtig ist [Carmeliet, 2005]. Über Hypoxie-induzierbare Faktoren, wie z. B. hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) wird die Expression von VEGF-Rezeptoren

stimuliert [Pugh und Ratcliffe, 2003; Götz et al., 2012]. Weiterhin sind Osteoblasten dazu in der Lage, VEGF zu synthetisieren [Bouletreau et al., 2002; Street et al., 2002], was die enge Beziehung zwischen Angiogenese und Osteogenese zeigt.

Da die physiologische, spontane Vaskularisierung nach Implantation eines Gewebekonstrukts sehr langsam ist, müssen für größere Gewebekonstrukte andere Vaskularisierungsstrategien entwickelt werden [Rouwkema et al., 2008; Laschke und Menger, 2012]. Die Verwendung von Scaffolds mit Wachstumsfaktoren ist auf Grund einer vom Empfängergewebe ausgehenden Vaskularisierung sehr zeitintensiv und nur auf wenige Mikrometer pro Tag beschränkt [Clark, 1939; Zarem, 1969; Orr et al., 2003]. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten und den Zelltod vor allem zentraler Bereiche großer Knochenersatzmaterialien zu reduzieren, steht zur Verbesserung der Vaskularisierung die Verwendung präformierter Mikrogefäßsysteme als Vaskularisierungsstrategie zur Verfügung [Lokmic und Mitchell, 2008]. Präformierte Mikrogefäßsysteme können z.B. *in vitro* durch Kultivierung von Scaffolds mit verschiedenen Zelltypen, welche für die Angiogenese und Vaskularisierung relevant sind, generiert werden [Laschke und Menger, 2012]. Andererseits ist eine Prävaskularisierung durch die Fähigkeit des Körpers als Bioreaktor zu fungieren auch *in situ* möglich. In diesem Fall wachsen Gefäße gut vaskularisierter Gewebe in implantierte Scaffolds ein [Laschke et al., 2008a]. Vorteil präformierter Mikrogefäßsysteme ist eine rasche Vaskularisierung des kompletten Konstrukts innerhalb einer kurzen Zeitspanne [Laschke und Menger, 2012]. Eine Verbesserung der Knochenvaskularisierung im Tissue Engineering kann über eine Imitation des physiologischen Knochengewebes wie z.B. durch die Verwendung von Osteoblasten und Endothelzellen in einem dreidimensionalen Sphäroid erreicht werden [Santos et al., 2009].

Das aus dem Griechischen stammende Wort „Sphäroid“ bedeutet ursprünglich abgeplattete Kugel. Heutzutage wird darunter die spontane Anordnung von Zellen zu einer dreidimensionalen, kugeligen Struktur verstanden. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts werden Sphäroide in verschiedenen Bereichen der Forschung verwendet [Holtfreter, 1944], wie z. B. der Tumorforschung [Santini und Rainaldi, 1999; Wang et al., 2012], embryonalen Stammzellforschung [Uchida et al., 2012], Neurobiologie [Ohara et al., 2004] oder der Regeneration von Hepatozyten [Ito et al., 2012]. Sphäroide sind konventionellen zweidimensionalen Zellkulturen überlegen, da sie auf Grund ihrer Dreidimensionalität intensive direkte Zell-Zell-Kontakte ausbilden [Ivascu und Kubbies, 2006]. Dies resultiert in einer höheren Stabilität und stellt die physiologische *in vivo* Situation besser dar [Korff und Augustin, 1998; Santini und Rainaldi, 1999]. Sphäroide sind zudem resistenter gegen Hypoxie und Apoptose als eine zweidimensionale Zellkultur [Bhang et al., 2011]. Außerdem können sie im Vergleich zur zweidimensionalen Zellkultur eine größere Anzahl an

angiogenen Wachstumsfaktoren, wie z. B. VEGF und FGF-2, freisetzen [Bhang et al., 2011]. Laschke et al. (2013) besiedelten Polyurethan-Scaffolds mit Sphäroiden aus murinen, vom Fettgewebe-abstammenden mesenchymalen Stammzellen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass diese sich durch eine deutlich höhere Vaskularisierung im Vergleich zu Kontroll-Scaffolds, welche mit Einzelzellen besiedelt wurden, auszeichneten.

Ein weiterer Vorteil von Sphäroiden ist die Möglichkeit, Ko-Kulturen herzustellen. Im Gegensatz zu Mono-Kultur-Sphäroiden bestehen Ko-Kultur-Sphäroide aus mehreren Zelltypen, welche die Zusammensetzung physiologischer Gewebe eher simulieren [Salgado et al., 2004]. Aktuell sind die molekularen Vorgänge innerhalb von Ko-Kultur-Sphäroiden noch unklar. Frühere Studien konnten jedoch eine gegenseitige Beeinflussung von Endothelzellen und Osteoblasten bei Ko-Kultivierung zeigen [Villars et al., 2000; Santos et al., 2009]. So können zum einen Endothelzellen die Differenzierung und Aktivität von Knochen-bildenden Zellen kontrollieren [Brandi und Collin-Osdoby, 2006] und zum anderen können Osteoblasten die Aktivität der Endothelzellen über Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF oder bFGF, beeinflussen [Deckers et al., 2002].

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Kombinationen aus primären humanen Osteoblasten (human osteoblasts, HOB), humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC) und normalen humanen dermalen Fibroblasten (normal human dermal fibroblasts, NHDF) verwendet, um Mono- und Ko-Kultur-Sphäroide zu züchten. HOB sind unreife Osteoblasten, welche sich in einen reifen, Knochen-bildenden Phänotyp differenzieren können [Metzger et al., 2013]. Sie sind wichtiger Bestandteil des Knochenmetabolismus, da sie die Knochenbildung und Knochenaktivität regulieren [van de Peppel und van Leeuwen, 2014]. Endothelzellen können unter anderem aus Haut, Fett- und Lungengewebe, der Aorta oder den Nabelgefäßen gewonnen werden [Cenni et al., 2011]. Sie sind in der Lage, tubuläre, Gefäß-ähnliche Strukturen auszubilden, wenn sie als Sphäroide in einem dreidimensionalen Kollagengel eingebettet sind [Korff et al., 2001]. Fibroblasten bilden den überwiegenden Anteil des Bindegewebes aus, welches für die strukturelle Festigkeit des Körpers und der extrazellulären Matrix verantwortlich ist. NHDF sezernieren zudem eine Vielzahl von Proteinen der extrazellulären Matrix [Klingberg et al., 2013] und haben zusätzlich die Eigenschaft, sich in Myofibroblasten differenzieren zu können [Metzger et al., 2007]. Myofibroblasten spielen in der Wundheilung eine wichtige Rolle, da sie durch ihre Kontraktilität den Wundverschluss beschleunigen können [Darby und Hewitson, 2007].

In der vorliegenden Studie wurden Mono- und Ko-Kultur-Sphäroide 72 Stunden nach Herstellung *in vitro* auf Apoptose und Ausbildung präformierter Mikrogefäße untersucht. Zum anderen wurden sie in Rückenhautkammern von CD1 Nu/Nu-Mäusen transplantiert, so dass über einen 14-tägigen Beobachtungszeitraum ihre Vaskularisierung analysiert werden konnte.

Das Rückenhautkammermodell erlaubt im Gegensatz zu anderen Tiermodellen unter Verwendung der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie eine repetitive *in vivo* Analyse der Angiogenese und Vaskularisierung transplanterter Gewebe [Menger et al., 2002; Laschke et al., 2011]. Zusätzlich ermöglicht diese Methode weitere immunhistochemische Analysen nach Abschluss der intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, welche Aufschluss über eine Inoskulation transplanterter Gewebekonstrukte im Empfängergerewebe geben können [Menger et al., 2002; Laschke et al., 2011].

4. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* und *in vivo* die Vaskularisierung von Mono- und Ko-Kultur-Sphäroiden für eine potentielle Anwendung im Knochen-Tissue Engineering untersucht. Hierfür wurden verschiedene Kombinationen von HOB, HDMEC und NHDF in Form von Ko-Kultur-Sphäroiden getestet (HOB-HDMEC 50% / 50% und HOB-HDMEC-NHDF 50% / 25% / 25%). HOB- und HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroide dienten als Kontrollgruppe. Aus Zellkulturen wurden die Sphäroide mittels der Liquid-Overlay-Methode hergestellt. *In vitro* wurde die Apoptose und zelluläre Organisation der Sphäroide 72 h nach Herstellung beurteilt. *In vivo* wurden die Sphäroide über einen 14-tägigen Beobachtungszeitraum in der Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen analysiert. Unter Verwendung der Technik der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie konnten Apoptose, Veränderungen der Sphäroidgröße und Vaskularisierung der Sphäroide untersucht werden.

Dabei wurde auf folgende Fragestellungen näher eingegangen:

- Welcher Sphäroidtyp zeigt 72 h nach Herstellung die geringste Apoptose-Rate?
- Sind die generierten Sphäroide dazu in der Lage, bereits *in vitro* Gefäß-ähnliche Strukturen auszubilden?
- Können die Sphäroide nach Transplantation in die Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen überleben und wachsen?
- Sind die transplantierten Sphäroide dazu in der Lage, ein funktionsfähiges Mikrogefäßsystem auszubilden, das über Verbindungen zum Gefäßsystem des Empfängergewebes (Inoskulation) mit Blut perfundiert wird?

5. Material und Methoden

5.1 Zellkultur

Alle verwendeten humanen Primärzellen wurden käuflich erworben (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) und als Masterzellbank expandiert. Vor der Sphäroidherstellung erfolgte eine Zelltyp-spezifische Kultivierung in einer 75 cm² Gewebekulturflasche (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) unter Standardzellkulturbedingungen (37°C, 95% Feuchtigkeit, 5% CO₂) mit einem zweitägigen Mediumwechsel, so dass eine konstante Zufuhr von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren gewährleistet und Stoffwechselabbauprodukte entfernt werden konnten.

HOB wurden in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) mit Zusatz von 15%igem fötalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS; PAA Laboratories GmbH) kultiviert. HDMEC wurden in einem endothelialen Wachstumsmedium (Endothelial Cell Growth Medium MV, PromoCell GmbH) und NHDF in Quantum 333 (PAA Laboratories GmbH) gezüchtet. Die Zellkultivierung erfolgte bis zur subkonfluenten Zelldichte. Danach wurden die Zellen passagiert oder es wurden Sphäroide generiert.

Für die Ablösung der Zellen mittels Trypsin (PAA Laboratories GmbH) wurde das gesamte Medium aus der Gewebekulturflasche abpipettiert und die Zellen mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS; OXOID, Hampshire, Großbritannien) bei 37°C gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3,5 ml Trypsin (Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat), 0,5 ml/mg Trypsin, 0,22 mg/ml EDTA; PAA Laboratories GmbH) behandelt und 3 min im Brutschrank inkubiert. Die Ablösung wurde mikroskopisch kontrolliert und die Zellen konnten bei Bedarf durch leichtes Klopfen an die Kulturflasche vom Boden gelöst werden. Nach Zugabe von 6,5 ml Zelltyp-spezifischem (HOB, HDMEC, NHDF) Kulturmedium stoppte die Trypsinreaktion, da dieses Proteaseinhibitoren enthielt. Nach mehrmaligem Resuspendieren wurde die komplette Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Gefäß (Greiner bio-one GmbH) überführt und bei 220 g für 4 min zentrifugiert (Biofuge primo, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. Nachdem in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (Greiner bio-one GmbH) 25 µl Zellsuspension und 25 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gemischt wurden, erfolgte die Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer (Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland).

5.2 Herstellung von Sphäroiden

Für die Herstellung von Sphäroiden wurde die Liquid-Overlay-Methode angewendet [Metzger et al., 2011]. Es wurden Mono-Kultur-Sphäroide aus 100% HOB oder 100% HDMEC sowie Ko-Kultur-Sphäroide bestehend aus HOB-HDMEC (50% HOB / 50% HDMEC) oder HOB-HDMEC-NHDF (50% HOB / 25% HDMEC / 25% NHDF) hergestellt.

1%ige sterile Agarose (Sigma-Aldrich) in Aqua wurde in der Mikrowelle bis zur kompletten Verflüssigung kurz aufgeköcht. Je 50 µl der Agarose wurden in die Kavitäten einer 96-Well Platte (flat bottom, Greiner bio-one GmbH) pipettiert und über einen Zeitraum von 1,5-2 h abgekühlt. Danach wurden pro Well je 100 µl Zellsuspension mit 50.000 Zellen pipettiert. Die Zellen waren nicht in der Lage, an die Agarose zu haften und bildeten daher Sphäroide durch Zell-Zell-Adhäsion aus. Nach 72 h Kultivierungszeit wurden die Sphäroide für histologische Analysen in Paraffin eingebettet oder im Rahmen der *in vivo* Versuche in die Rückenhautkammer transplantiert.

5.3 Histologische und immunhistochemische Analyse der Sphäroide

5.3.1 Einbetten der Sphäroide und Anfertigung histologischer Schnitte

Als Vorbereitung für die histologischen und immunhistochemischen Analysen im Rahmen der *in vitro* Versuche wurden die Sphäroide 72 h nach Herstellung eingebettet. Hierfür wurde als Grundlage 100 µl Hepato-Quick (Roche) in 2 ml Aqua dest. (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gelöst und 50 µl humanes Citratplasma (hergestellt im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Homburg, Deutschland) mit 10 µl Calciumchlorid (10%; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) luftblasenfrei in den Deckel eines Standardreaktionsgefäßes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) pipettiert. Diese Suspension wurde 20 min im Brutschrank bei Standardbedingungen inkubiert. Die Sphäroide wurden dann auf das im Brutschrank getrocknete Gel gegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass überschüssiges Medium komplett und gründlich entfernt wurde. Zum Abschluss wurden die Sphäroide mit Hepato-Quick, humanem Citratplasma und Calciumchlorid wie oben beschrieben bedeckt und das Gemisch erneut für 20 min im Brutschrank inkubiert.

Die eingebetteten Sphäroide wurden für 24 h in Paraformaldehyd (Roti® Histofix 4%, Carl Roth GmbH + Co. KG) zur Stabilisierung des Gewebes fixiert. Daraufhin wurde die Probe mit Alkohol in aufsteigender Konzentration (70%, 80%, 90%, dreimal 100% Ethanol, hergestellt aus Ethanol 99% vergällt mit 1% Methylethylketon; Biesterfeld Chemiedistribution, Hamburg, Deutschland) für jeweils 1 h entwässert und in Xylol (Acros Organics, Glee, Belgien) überführt.

Das Gewebe wurde mit heißem Paraffin (Carl Roth GmbH + Co. KG) durchtränkt und in einem Histonetz (neolab, Heidelberg, Deutschland) fixiert. Nach Erkalten entstanden kleine Paraffinquader, aus welchen 5 µm dicke Schnitte mit dem Mikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) hergestellt wurden. Bei 43°C glätteten sich die Schnitte im Streckbad (Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland). Darauf wurden sie auf Objektglaträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland), welche mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich), 1:10 verdünnt mit Aqua dest. beschichtet wurden, aufgezogen. Die Schnitte trockneten über Nacht bei 60°C im Wärmeschrank (Haraeus).

5.3.2 Histologie

Als Standardfärbung zur Lokalisierung der Sphäroide wurde jeder sechste Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen blau, unter anderem Zellkerne mit darin enthaltender Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribosomen und das raue endoplasmatische Retikulum. Eosin hingegen färbt alle acidophilen Strukturen rot, was vor allem Zellplasmaproteine entspricht.

Die Schnitte wurden zuerst über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70% Ethanol) entparaffiniert und 1 min mit Hämatoxylin nach Böhmer gefärbt. Dieses wurde aus zwei Lösungen hergestellt: Lösung 1) 1 g Hämatoxylin (Carl Roth GmbH + Co. KG) gelöst in 10 ml Ethanol und Lösung 2) 20 g Kaliumaluminiumsulfat (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) gelöst in 200 ml warmem Aqua dest., welches nach dem Erkalten gefiltert wurde. Hierauf folgte die Differenzierung mit Salzsäure (HCl)-Alkohol (198 ml 70%iges Ethanol und 2 ml konzentrierte 37%ige HCl (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland)). Nach erneutem Spülen wurde unter fließendem Leitungswasser 7 min lang mit Hämatoxylin gebläut. Für 6 s wurde mit Eosin, hergestellt aus 2 g gelblichem Eosin (Carl Roth GmbH & Co. KG), gelöst in 200 ml Aqua dest. und 6 Tropfen Essigsäure (100%, Merck KGaA), gefärbt. Die Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70% bis 90% durch kurzes Eintauchen und bei reinem Alkohol für zweimal 2 min. In Xylol wurden die Schnitte für dreimal 10 min geklärt und mit Roti® Histokitt II (Carl Roth GmbH + Co. KG) eingedeckt.

5.3.3 Immunhistochemie

Bei immunhistochemischen Färbungen werden Proteine mit Hilfe von Antikörpern gefärbt. Es handelt sich um eine Antigen-Antikörperreaktion, die auf der Affinität zwischen Antikörper und Epitop beruht. Primärantikörper sind direkt gegen das Epitop gerichtet, ohne dass eine Kreuzreaktion mit anderen Epitopen stattfindet. Sie haben eine hohe Spezifität und Affinität. Sekundärantikörper können einen spezifischen Primärantikörper binden und sind mit einem Enzym gekoppelt.

Bei der Immunhistochemie werden direkte und indirekte Methoden voneinander unterschieden. Bei der direkten Methode reagiert der Enzym-gekoppelte Primärantikörper mit dem Epitop des Antigens und durch Zugabe eines Substrates kommt es zur Enzymreaktion bei allen gebundenen Antikörpern. Die indirekte Methode erfolgt durch einen sekundären Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist. So entsteht ein Komplex aus Primärantikörper, der an das Epitop des Antigens bindet, mit dem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper. Zur Farbreaktion kommt es wiederum durch Zugabe von Substrat, welches mit dem gebundenen Enzym des Sekundärantikörpers reagiert.

5.3.3.1 Apoptose

Caspase-3 gehört zur Gruppe der Cysteinproteasen, welche Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten können. Das Enzym ist sowohl bei der intrinsischen als auch extrinsischen Apoptose beteiligt und wird über Caspase 8 (extrinsisch) oder 9 (intrinsisch) aktiviert. Die cleaved Caspase-3-Färbung diente in der vorliegenden Arbeit zur Darstellung apoptotischer Zellen.

Nach der Entparaffinierung wurden die Paraffinschnitte in der Mikrowelle (Panasonic, Osaka, Japan) bei 600 W in 200 ml Citratpuffer (1 l hergestellt aus 1,922 g Citraconsäureanhydrid [Sigma-Aldrich], 900 ml Aqua dest und 13 ml 2 molarer Natronlauge (NaOH) (VWR International GmbH)) bei pH 6 angedaut. Für 10 min wurde daraufhin mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2 ; 3%; Fischer, Saarbrücken, Deutschland) die endogene Peroxidase geblockt und mit Aqua dest. und PBS erneut gespült.

Für die cleaved Caspase-3 Färbung inkubierten 50 µl des Blockierungsreagenz bestehend aus 1 ml PBS mit 30 µl Normalserum (3%iges Ziegenserum, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit 50 µl des Primärantikörpers Kaninchen-anti-Mensch anti-Caspase-3 (1:100; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Danach wurden 50 µl des Sekundärantikörpers Ziege-anti-Kaninchen (1:100; Jackson ImmunoResearch Laboratories) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Je 50 µl des Gemisches aus 1 ml Aqua dest. und einem Kit aus 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und H_2O_2 (Sigma-Aldrich) setzten die Enzymfarbreaktion des Sekundärantikörpers in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur um. Nach Spülen mit Aqua dest. wurden die Schnitte in Hämalun nach Meyer (VWR International GmbH) gefärbt, in welches sie dreimal eingetaucht wurden. Zum Abschluss wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70% bis 90% kurz und bei 100% Ethanol für zweimal 3 min entwässert. Nach dreimal 10 min Inkubation in Xylol wurden die Schnitte mit Roti® Histokitt II eingedeckt.

Für die *in vitro* Analysen wurden fünf bis acht Sphäroide beurteilt (HOB: n = 8; HDMEC: n = 7; HOB-HDMEC: n = 7; HOB-HDMEC-NHDF: n = 5). Die Schnitte wurden mit

einem Lichtmikroskop (Olympus Optical Co.) ausgewertet. Pro Sphäroid wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen in zwei bis drei Gesichtsfelder (high power field (HPF)) erfasst und als Anzahl/HPF [%] angegeben. Bei allen Färbungen wurden Positiv- und Negativkontrollen angefertigt.

5.3.3.2 Vaskularisierung

Die immunhistochemische anti-humane CD31-Fluoreszenzfärbung erlaubte *in vitro* die Darstellung der Verteilung und Organisation von CD31-positiven HDMEC in den verschiedenen Sphäroidgruppen. Nach Entparaffinierung wurde mit PBS/Tween (1 l PBS mit 100 µl Tween® 2 (Carl Roth GmbH & Co. KG)) gespült. Danach wurden die Schnitte für eine Stunde bei 97°C im Wasserbad in 0,05% verdünntem Citraconsäureanhydrid-Puffer (98%) gekocht und für mindestens 30 min abgekühlt. Nach 10 min in PBS/Tween wurden sie für 30 min mit 3%igem Ziegeserum geblockt. Die Inkubation mit dem Kaninchen-anti-Mensch anti-CD31 Primärantikörper (1:30; abcam, Cambridge, Großbritannien) erfolgte bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte für 2 h bei 37°C im Wasserbad die Inkubation mit dem Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 Sekundärantikörper (1:50; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Als letzten direkten Färbeschritt wurden die Zellkerne mit Bisbenzimid (1:500; Sigma-Aldrich) 5 min lang inkubiert. Nach Spülung mit PBS/Tween und Aqua dest. wurden die Schnitte mit Glycingelatine (Merck KGaA) eingedeckt und bei 4°C gelagert.

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung eines BZ-8000 Fluoreszenzmikroskops (Keyence, Osaka, Japan). Repräsentativ wurde ein Sphäroid pro Gruppe gefärbt, so dass *in vitro* die Anordnung humaner Endothelzellen innerhalb der Sphäroide dargestellt werden konnte.

5.4 *In vivo* Analyse der Sphäroide in der Rückenhautkammer

5.4.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten immuninkompetente CD1 Nu/Nu-Nacktmäuse aus eigener Zucht des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar. Zum Zeitpunkt der Experimente waren die Mäuse maximal 6 Monate alt, was einem Körpergewicht von 23-30 g entsprach. Die Tiere wurden in individuell belüfteten Käfigen (Tecniplast, Buguggiate, Italien) bei einer Raumtemperatur von 22-24°C mit einer relativen Feuchtigkeit von 60-65% in einem 12 h/12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Sie hatten Zugang zu Standardfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser *ad libitum*.

Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde (Ministerium für Umwelt und Verbraucherschutz, Referat D/3, Saarbrücken, Deutschland) unter dem Aktenzeichen

32/2009 genehmigt und am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

5.4.2 Rückenhautkammer

Die Versuchstiere wurden für die Operation mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion von 75 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ursotamin®, C₁₃H₁₆ClNO; Serumwerk, Bernburg, Deutschland) und 25 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun®, C₁₂H₁₆N₂S; Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Obwohl die Mäuse während der 17 Tage dauernden Versuche insgesamt sechsmal narkotisiert wurden, zeigten sich keine Veränderungen in ihrem Fress-, Schlaf- oder Putzverhalten.

Die Rückenhautkammer bestand aus zwei symmetrischen Titanrahmen (Abb. 1). Diese wurden an der Rückenhautfalte der Maus fixiert.

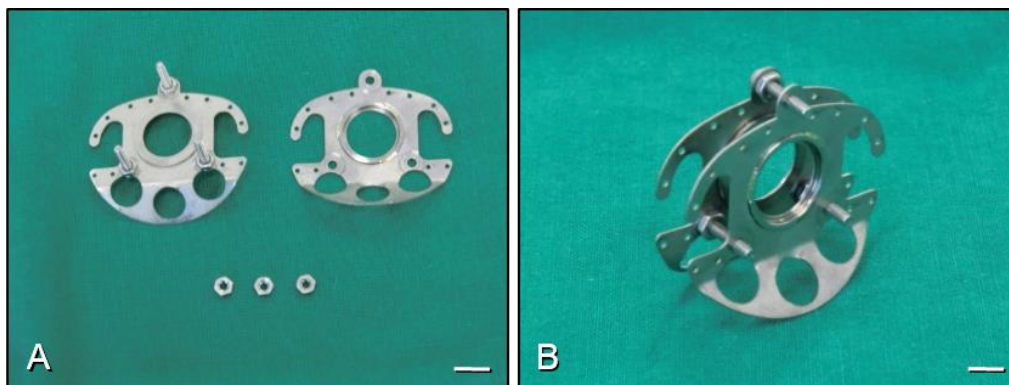


Abb. 1: Darstellung der Rückenhautkammer. Zwei symmetrische Titanrahmen (A), welche über drei Schrauben miteinander verbunden werden (B), bilden die Rückenhautkammer. Maßstab: A: 8 mm; B: 5 mm.

Um das Infektionsrisiko zu minimieren, wurde präoperativ das Operationsfeld mit Softasept® N-Spray (B. Braun Melsungen AG) desinfiziert. Alle Instrumentarien, Abdecktücher, Titankammern, Schrauben, Muttern, Wattestäbchen sowie Kompressen wurden autoklaviert und es wurde mit Mundschutz, Operationshaube und Handschuhen operiert. Um eine Unterkühlung der Tiere während der Anästhesie und Operation zu vermeiden, wurde eine Wärmematte (ThermoLux® Wärmeunterlagen, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) während der Kammerpräparation verwendet. Gegen das Austrocknen der Augen während der Anästhesie wurde auf die Kornea Bepanthen® Augensalbe (Bayer Health Care) dünn aufgetragen. Die Maus wurde horizontal vor einer Kaltlichtlampe (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) positioniert und die Rückenhautfalte unter Gegenlichtkontrolle angehoben, so dass die von beiden Seiten zuführenden Hauptgefäße zur Deckung gebracht werden konnten (Abb. 2 A, B). Als nächstes erfolgte die Fixierung der Rückenhautfalte an einem Metallbalken mittels zwei Haltnähten, die sich jeweils 2-3 mm lateral der versorgenden Hauptgefäße befanden.

Der rückseitige Rahmen der Rückenhautkammer mit den Schrauben wurde an der dem Operateur abgewandten Seite der gedoppelten Hautfalte platziert und mit zwei Nähten an der Hautfalte fixiert. Unter Gegenlichtkontrolle wurde die Rückenhaut in Höhe der unteren Schrauben der Titankammer perforiert. Die Schrauben wurden durch die Perforation durchgeführt, so dass eine Fixierung der Kammer mittels zwei Klemmen möglich war (Abb. 2 C). Dies erlaubte es, später den zweiten Kammerrahmen mit dem ersten zu verbinden.

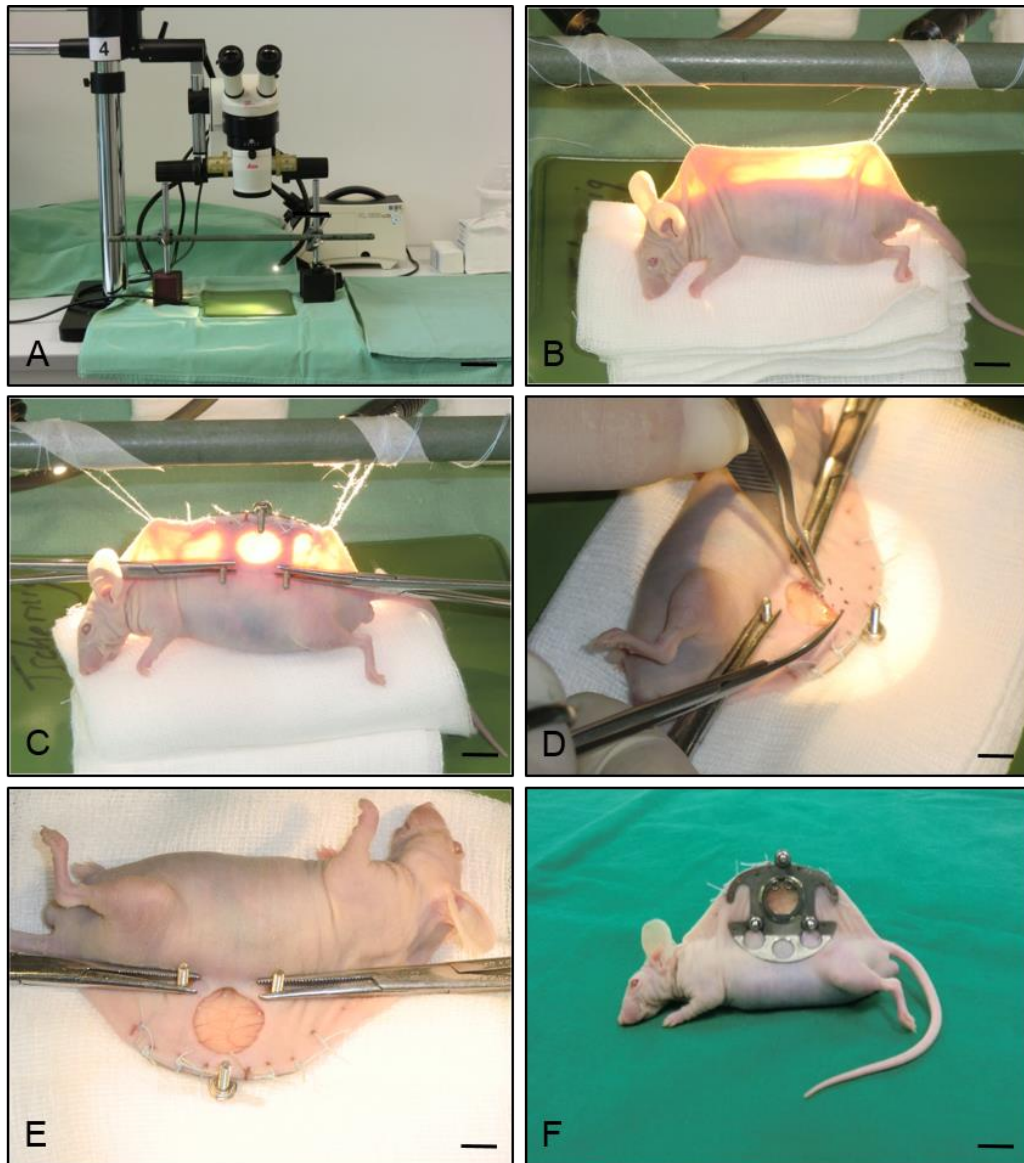


Abb. 2: Übersicht des Arbeitsplatzes zur Präparation einer Rückenhautkammer mit Operationsmikroskop, Wärmematte und Kaltlichtlampe (A). Rückenhautkammerpräparation an einer CD1 Nu/Nu-Maus (B-F). Die Rückenhautfalte wird mit zwei Haltenähten fixiert (B) und der hintere Kammerrahmen befestigt (C). Anschließend kann in Rechtsseitenlage die Cutis (D) und das Subkutangewebe (E) entfernt werden. Zuletzt wird der vordere Titanrahmen der Rückenhautkammer aufgesetzt (F). Maßstab: A: 5 cm; B, C, F: 8,5 mm; D, E: 6,5 mm.

Zur optimalen Positionierung des späteren Beobachtungsfensters wurde unter Gegenlichtkontrolle mit einem wasserfesten Hautstift (Multimark permanent, Faber-Castell, Ahrensburg, Deutschland) das Präparationsfeld auf die dem Operateur zugewandte

Rückenhautseite mit ca. zwölf Orientierungspunkten eingezeichnet. Daraufhin konnten die Haltenähte entfernt und die Maus unter ein Operationsmikroskop (Leica Microsystems) in Rechtsseitenlage positioniert werden. Die Entfernung der obersten Hautschicht erfolgte nach erneuter Hautdesinfektion durch eine Präparationsschere unter Anhebung des Hautlappens mit einer chirurgischen Pinzette (*Abb. 2 D*). Sofort danach wurde das Präparationsfeld mit 0,9%iger Natriumchlorid (NaCl)-Spüllösung (Ecotainer® NaCl 0,9%, B. Braun Melsungen AG) gespült. Zur Infektophylaxe wurde das Operationsbesteck gewechselt.

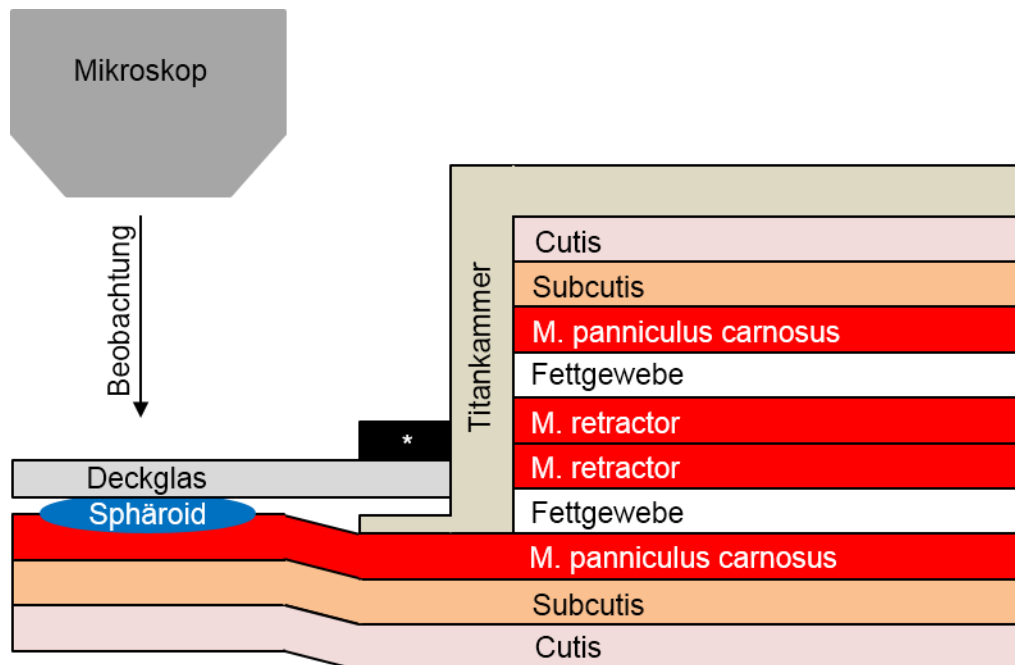


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Rückenhautkammerquerschnitts nach Präparation. Während der Präparation der Rückenhautkammer werden Haut, Subkutangewebe und *M. panniculus carnosus* und beide *Mm. retractores* entfernt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Sphäroide auf den *M. panniculus carnosus* transplantiert. Danach wurde das Gewebe Deckglas, welches der Titan-kammer auflag und durch einen Sprengling (Stern) fixiert wurde, verschlossen.

Zur Freilegung des Beobachtungsfensters wurden die Haut, das Subkutangewebe und der *M. panniculus carnosus* der einen Seite und beide *Mm. retractores* entfernt (*Abb. 2 E*, *Abb. 3*). Nach vollständiger Präparation wurde erneut mit 0,9%igem NaCl gespült. Der zweite Titanrahmen (*Abb. 1*, *Abb. 2 F*) wurde auf sein Gegenstück gesetzt und fixiert. Zum Schutz des präparierten Gewebes wurde dieses mit einem Deckglas bedeckt, welches mit einem Sprengling fixiert wurde. Damit sich die Maus mit der Rückenhautkammer nicht in den Gitterstäben des Käfigs verhaken konnte, wurden die Schrauben knapp oberhalb der Mutter mittels einer Zange gekürzt. Nach der Operation wurde der Maus 0,3 ml 0,9%iges NaCl i.p. injiziert, um den Flüssigkeitsverlust während des Eingriffs auszugleichen. Bis zum Wiedererlangen der Mobilität wurde der Käfig in einem Abstand von 25 cm vor einer Rotlichtlampe (Rotlicht Sanitas, Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, Deutschland) platziert.

5.4.3 Transplantation der Sphäroide

Die Transplantation der Sphäroide in die Rückenhautkammer erfolgte drei Tage nach ihrer Herstellung. Vor Transplantation wurden sie für 20 min in DMEM (10%iges FCS; 0,1 mg/ml Penicillin/Streptomycin [PAA Laboratories GmbH]) mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Bisbenzimid (2 µg/ml) zur späteren Detektion der Sphäroide und apoptotischen Zellen nach Transplantation in die Rückenhautkammer gefärbt. Der Färbung folgte eine Waschung mit PBS. In der Zwischenzeit wurden die Mäuse narkotisiert und auf einer Plexiglasbühne in Rechtsseitenlage fixiert (*Abb. 4 A*). Sprengring und Deckglas wurden vorsichtig entfernt und das Kammergewebe mehrfach mit 0,9%igem NaCl gespült. Pro Tier wurden jeweils drei Bisbenzimid-gefärbte Sphäroide in Anordnung eines gleichseitigen Dreiecks (*Abb. 4*) transplantiert. Vor den lichtmikroskopischen Übersichtsaufnahmen und der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie wurde die Kammer mit einem neuen Deckglas und Sprengring verschlossen.

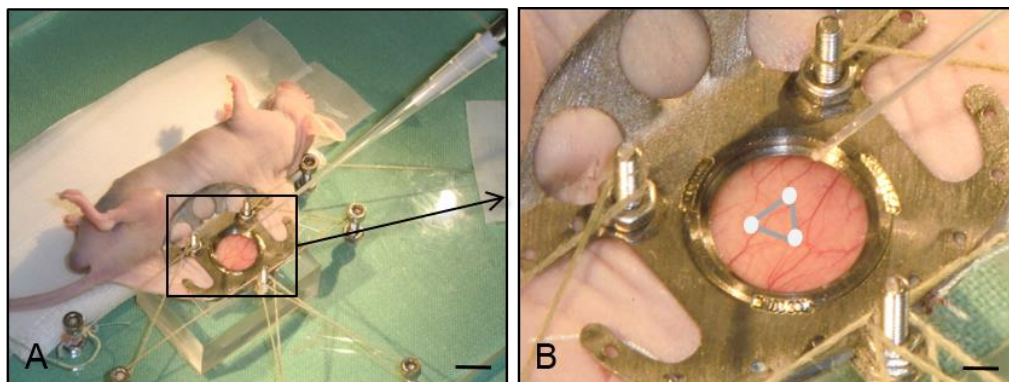


Abb. 4: Transplantation der Sphäroide in die Rückenhautkammer einer CD1 Nu/Nu-Maus, welche narkotisiert und in Rechtsseitenlage auf einer Plexiglasbühne nach Entfernung von Sprengring und Deckglas fixiert ist (**A**). Drei Sphäroide (weiße Kreise) werden mittels einer Pinzette in Anordnung eines gleichseitigen Dreiecks auf den *M. panniculus carnosus* transplantiert (**B**). Maßstab: **A**: 9,5 mm; **B**: 2,5 mm.

5.4.4 Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen

Vor der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie wurden direkt nach Transplantation (Tag 0) und an den Tagen 3, 6, 10 und 14 lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen (Leica Microsystems) der transplantierten Sphäroide angefertigt (*siehe auch Abb. 19*). Diese dienen der makroskopischen Beurteilung des Kammergewebes.

5.4.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

5.4.5.1 Aufbau des intravitalem Fluoreszenzmikroskops

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Auflichtmikroskop (Zeiss) durchgeführt (*Abb. 5*). Zwei verschiedene Filterblöcke konnten in den Strahlengang eingeschoben werden und Licht unterschiedlicher Wellenlängen filtern. Auf diese Weise

konnte jeweils ein Farbstoff selektiv sichtbar gemacht werden. Die Blöcke enthielten Filter für blaues (450-490 nm Anregungswellenlänge / > 520 nm Emissionswellenlänge; Farbstoff: Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)-Dextran) und ultraviolettes Licht (UV; 330-390 nm Anregungswellenlänge / > 430 nm Emissionswellenlänge, Farbstoff: Bisbenzimid).

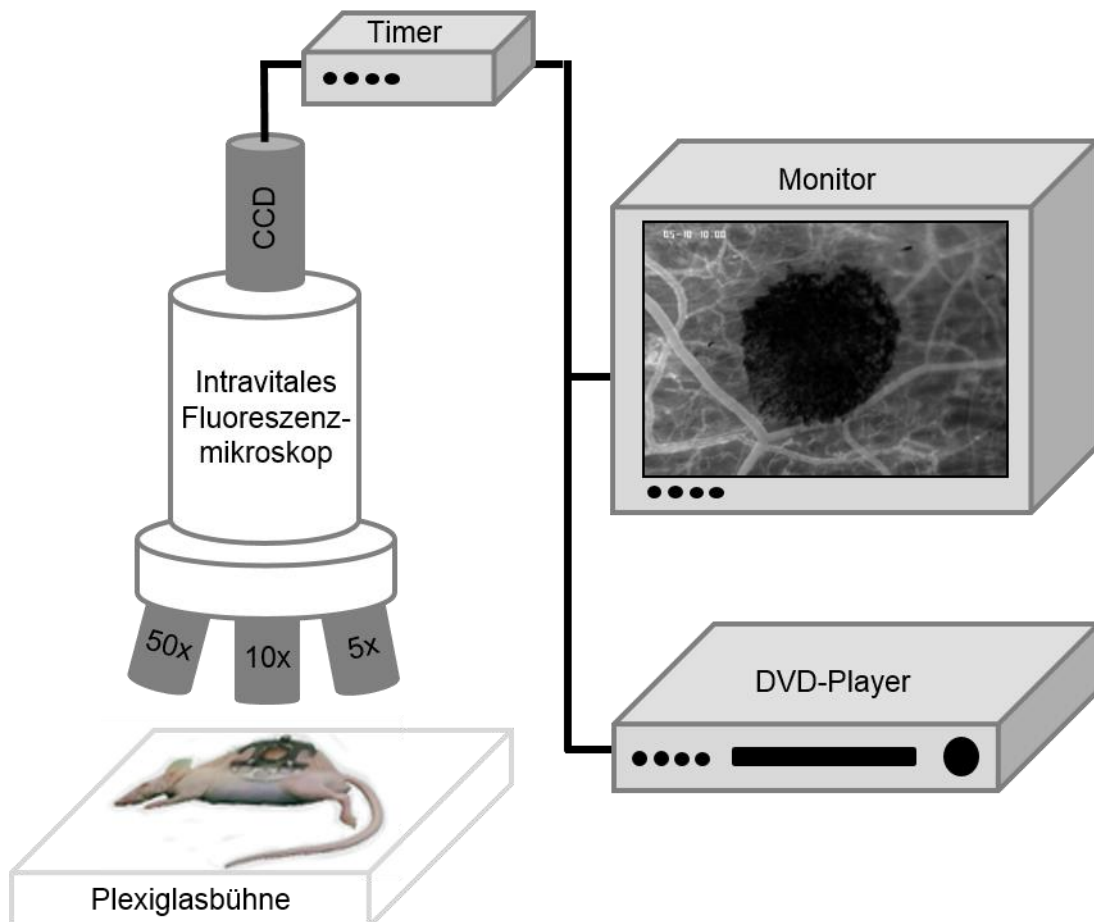


Abb. 5: Schematischer Aufbau des Arbeitsplatzes für die Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Die narkotisierte CD1 Nu/Nu-Maus ist auf einer Plexiglasbühne in Rechtsseitenlage fixiert. Mittels des intravitalen Fluoreszenzmikroskops, der CCD-Kamera und des DVD-Rekorders können die Aufnahmen am Monitor verfolgt und aufgezeichnet werden. Der Video-Timer ermöglicht eine spätere Identifikation der Versuchsaufnahme.

Der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Sigma-Aldrich; Abb. 6), welcher bevorzugt an Adenin-Thymin-reiche Sequenzen bindet, wurde zum Anfärben von nukleärem Chromatin verwendet. Hierdurch konnten unversehrte Kerne, aber auch durch Apoptose entstandene Kernfragmente, dargestellt werden. Diese Fluoreszenzfärbung ermöglichte die Quantifizierung der apoptotischen Zellen innerhalb eines Sphäroids, welche sich durch morphologische Zeichen wie Kondensation, Fragmentierung und Margination des nukleären Chromatins von normalen Zellen unterscheiden ließen. Außerdem konnten die gefärbten Sphäroide von ihrer ungefärbten Umgebung abgegrenzt und somit ihre Größe bestimmt werden.

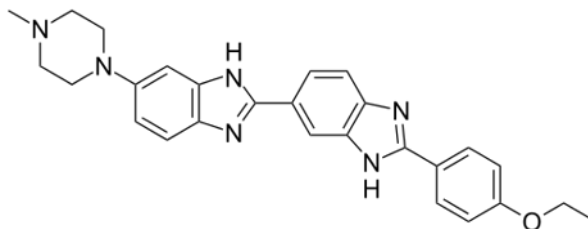


Abb. 6: Strukturformel von Bisbenzimid ($C_{27}H_{28}N_6O$).

Das verwendete FITC-Dextran (Sigma-Aldrich; Abb. 7) wies ein Molekulargewicht von 150.000 Dalton (Da) auf. Durch diesen Fluoreszenzfarbstoff wurde das Blutplasma gefärbt, was eine kontrastreiche Darstellung der Gefäße bei einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm (Blau-Filter) in Epi-Illumination ermöglichte. Vor Beginn der Fluoreszenzmikroskopie wurden 0,05 ml des Farbstoffes in den retrobulbären Venenplexus injiziert.

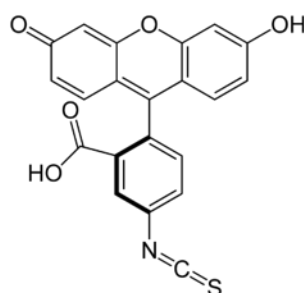


Abb. 7: Strukturformel von FITC ($C_{21}H_{11}NO_5S$).

Die intravitalfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer charged coupled-device (CCD)-Videokamera (Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgezeichnet und auf einen Monitor (Sony corp., Tokio, Japan) und an einen DVD-Videorekorder (Samsung, Seoul, Südkorea) übertragen (Abb. 5). Ein Video-Timer (FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan), welcher eine Einblendung des Zeitpunkts der Videoaufnahme und der Identifikationsnummer des Tieres ermöglichte, wurde zwischen Videokamera und Monitor geschaltet (Abb. 5). So konnte jeder Aufnahme die Gruppenzugehörigkeit und Nummer des Tieres zugeordnet werden.

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden verschiedene Objektive verwendet: Ein 5x Objektiv (Zeiss) für Übersichtsaufnahmen und zur Größenbestimmung der Sphäroide, ein 10x Objektiv (Zeiss) zur generellen Beurteilung der Sphäroidstruktur und ein 50x Objektiv (Zeiss) zur Erfassung des apoptotischen Zelltods.

Die narkotisierten Mäuse wurden auf eine eigens für diesen Zweck angefertigte Plexiglasplatte in Rechtsseitenlage fixiert, um das zu untersuchende Gewebe horizontal unter das Mikroskop positionieren zu können.

5.4.5.2 Ablauf der Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde für alle Versuchstiere bei einer Raumtemperatur zwischen 22-24°C durchgeführt. Bei jeder Mikroskopie erfolgte die Untersuchung der Sphäroide in gleicher Reihenfolge (Abb. 8).

Zuerst wurde eine Übersichtsaufnahme des Sphäroids bei einer Anregungswellenlänge von 330-390 nm (UV-Filter) zur späteren Größenbestimmung bei fünffacher Vergrößerung (5x Objektiv) aufgenommen. Daraufhin wurden weitere Übersichtsaufnahmen bei Anregungswellenlängen von 330-390 nm (UV-Filter) und 450-490 nm (Blau-Filter) in zehnfacher Vergrößerung (10x Objektiv) aufgezeichnet. Es wurde darauf geachtet, alle Sphäroidanteile zu erfassen. Der apoptotische Zelltod wurde unter Verwendung der Anregungswellenlänge von 330-390 nm (UV-Filter) in 50x Vergrößerung analysiert.

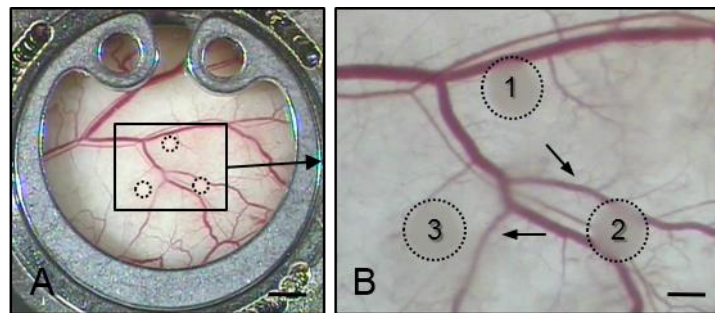


Abb. 8: Lichtmikroskopische Darstellung der Aufnahmenreihenfolge der in die Rückenhautkammer einer CD1 Nu/Nu-Maus transplantierten Sphäroide. Jede intravitalluoreszenzmikroskopische Aufnahme begann mit Sphäroid 1. Im Uhrzeigersinn wurde die Mikroskopie der beiden anderen Sphäroide fortgeführt. Maßstab: **A:** 1,7 mm; **B:** 0,5 mm.

Alle aufgezeichneten fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden offline mit Hilfe des computergestützten Analyseprogramms CapImage (Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Nach Abschluss der intravitale Fluoreszenzmikroskopie an Tag 14 nach Transplantation wurden die Tiere mit einer Überdosis des Narkosegemisches per i.p. Injektion euthanasiert.

5.4.5.3 Analyisierte Parameter

a) Sphäroidgröße

Die Bestimmung der Sphäroidgröße erfolgte bei fünffacher Vergrößerung und einer Anregungswellenlänge von 330-390 nm (UV-Filter). Die Sphäroide ließen sich durch die Bisbenzimid-Färbung vom nicht angefärbten, umliegenden Kammergewebe abgrenzen. Die Sphäroidgröße wurde an Tag 0 und 14 bestimmt und der Quotient (Tag 14/Tag 0) der beiden Analysezeitpunkte berechnet.

b) Apoptotischer Zelltod

Die Anzahl apoptotischer Zellen innerhalb eines Sphäroids wurde bei einer Anregungswellenlänge von 330-390 nm (UV-Filter) erfasst. Hierfür wurden die Bisbenzimid-gefärbten Zellen in drei bis vier HPF pro Sphäroid an Tag 0 und 3 nach Transplantation ausgezählt. Die charakteristischen morphologischen Zeichen des apoptotischen Zelltods, wie Kondensation, Fragmentierung und Margination des nukleären Chromatins, dienten dabei zur Identifizierung apoptotischer Zellen [Westermann et al., 1999; Vollmar et al., 2001].

c) Intrinsische Vaskularisierung und Perfusion

Die intrinsische Vaskularisierung der Sphäroide wurde definiert als das Vorhandensein von neu gebildeten Mikrogefäßen innerhalb der Transplantate. Auf Grund ihrer Lokalisation konnten sie von murinen Gefäßen abgegrenzt werden, da sie innerhalb des Sphäroids entstanden.

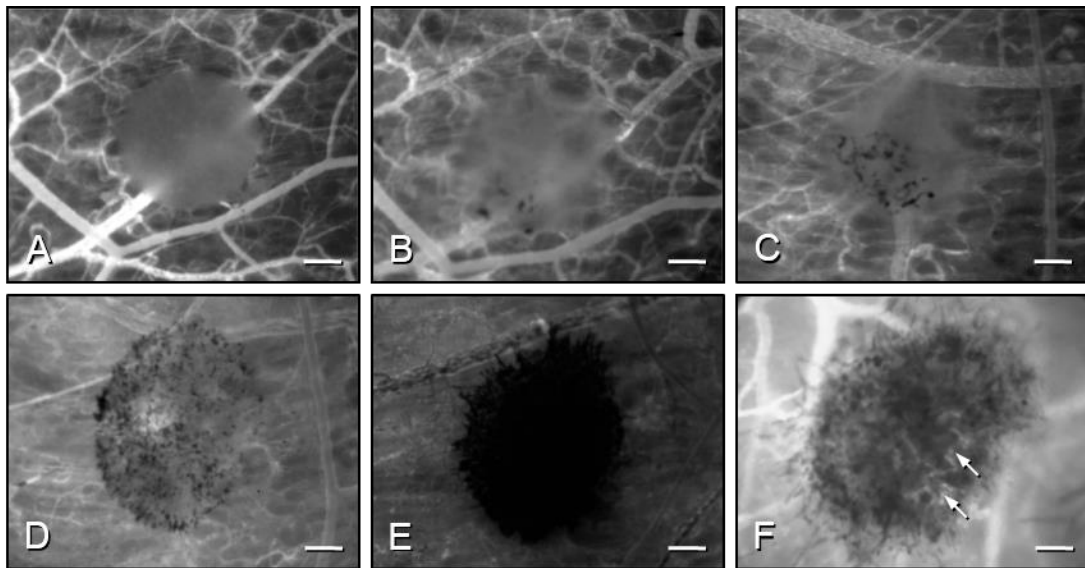


Abb. 9: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der in die Rückenhautkammer einer CD1 Nu/Nu-Maus transplantierten Sphäroide. Beispielhafte Darstellung der intrinsischen Vaskularisierung, welche mit einem semiquantitativen Score ausgewertet wurde (**A-E**): 0 = kein Hinweis auf eine intrinsische Vaskularisierung (**A**); 1 = intrinsische Vaskularisierung in weniger als 25% der Sphäroidfläche (**B**); 2 = intrinsische Vaskularisierung in 25-50% der Sphäroidfläche (**C**); 3 = intrinsische Vaskularisierung in 50-100% der Sphäroidfläche (**D**); 4 = intrinsische Vaskularisierung über die Sphäroidfläche hinausgehend (**E**). **F:** Sphäroid, welches 14 Tage nach Transplantation FITC-Dextran-perfundierte Mikrogefäße (Pfeile) aufweist. Fluoreszenzaufnahmen bei einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm (Blau-Filter) mit Kontrastverstärkung durch FITC-Dextran 150.000 i.v.. Maßstab: **A-E**: 220 μ m; **F**: 140 μ m.

Die *in vitro* präformierten Mikrogefäße füllten sich im Beobachtungsverlauf mit Erythrozyten, da sie in der Lage waren, mit dem murinen Gefäßsystem des Empfängergewebes Verbindungen einzugehen. Die Mikrogefäße erschienen sowohl bei einer Anregungswellenlänge von 330-390 nm (UV-Filter) als auch bei 450-490 nm (Blau-Filter) als schwarze Strukturen, wenn sie zum Zeitpunkt der Beobachtung nicht mit FITC-Dextran-markiertem Blutplasma gefüllt waren. Die Analyse der intrinsischen

Vaskularisierung erfolgte mittels eines semiquantitativen Scores: 0 = kein Hinweis auf eine intrinsische Vaskularisierung; 1 = intrinsische Vaskularisierung in weniger als 25% der Sphäroidfläche; 2 = intrinsische Vaskularisierung in 25-50% der Sphäroidfläche; 3 = intrinsische Vaskularisierung in 50-100% der Sphäroidfläche; 4 = intrinsische Vaskularisierung über die Sphäroidfläche hinausgehend (*Abb. 9 A-E*).

14 Tage nach Transplantation in die Rückenhautkammer wurde die Perfusion der neu gebildeten Mikrogefäße evaluiert. Die Analyse der Perfusion erfolgte mittels eines qualitativen Scores, welcher prozentual diejenigen Sphäroide erfasste, welche FITC-Dextran-perfundierte Mikrogefäße ausbildeten (*Abb. 9 F*). Qualitativer Score: 0 = kein Hinweis auf eine Perfusion; 1 = sichtbare Perfusion oder Nachweis von FITC-Dextran-markiertem Blutplasma innerhalb des Sphäroids.

5.4.6 Histologie und Immunhistochemie

Nach Abschluss der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie an Tag 14 wurden die transplantierten Sphäroide für histomorphologische Untersuchungen in 4%igem Paraformaldehyd (Carl Roth GmbH + Co. KG) für 24 h fixiert. Nach Einbettung in Paraffin erfolgte die Anfertigung von Serienschnitten. Jeder sechste Serienschnitt wurde mit HE gefärbt, so dass eine Beurteilung der Sphäroide erfolgen konnte. Bei der Auswahl der Schnitte für immunhistochemische Färbungen wurde darauf geachtet, dass die Sphäroide nicht am Rand sondern zentral angeschnitten wurden, um immunhistochemisch eine möglichst große Fläche des Sphäroids beurteilen zu können.

5.4.6.1 Apoptose

Für die Analyse der cleaved Caspase-3-gefärbten Schnitte wurden pro Gruppe sechs Tiere mit zwei Schnitten je Sphäroid analysiert. Die Analyse erfolgte wie bereits in 5.3.3.1 beschrieben.

5.4.6.2 Vaskularisierung

Die Herkunft von Mikrogefäßen innerhalb der Sphäroide wurde unter Verwendung von Antikörpern gegen humanes und murines CD31 untersucht. Hierbei wurden die Zellkerne mittels Bisbenzimid blau gefärbt.

Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte für eine Stunde bei 97°C im Wasserbad in Citraconsäureanhydrid-Puffer bei pH 7,4 gekocht. Für die anti-humane CD31-Färbung wurde mit dem Kaninchen-anti-Mensch Primärantikörper (1:200; abcam) und für die anti-murine CD31-Färbung mit einem Ratte-anti-Maus Primärantikörper (1:30; dianova, Hamburg, Deutschland) über Nacht bei 4°C und am nächsten Tag für 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde bei der anti-humanen CD31-Färbung Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 (rot; 1:400; Jackson ImmunoResearch Laboratories) und bei der

anti-murinen CD31-Färbung Ziege-anti-Ratte-Alexa488 (grün; 1:400; invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid (1:500) 5 min lang gefärbt. Nach Spülung mit PBS/Tween und Aqua dest. wurden die Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt und bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte zeitnah nach der Herstellung unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Keyence) für die quantitative Analyse der humanen und murinen Gefäßdichte innerhalb des Sphäroids, welche in mm^{-2} angegeben wurde.

Für die Analyse der CD31-Färbung wurden pro Gruppe sechs Tiere mit je einem Sphäroid ausgesucht. Die Sphäroidfläche wurde mittels 6x Vergrößerung bestimmt. Sonstige Übersichtsaufnahmen erfolgten bei 5x Vergrößerung und die HPF-Auswertung bei 40x Vergrößerung.

5.5 Versuchsprotokoll

Wie Abb. 10 veranschaulicht, wurden die Versuche in einen *in vitro* und einen *in vivo* Abschnitt eingeteilt. An Tag -3 wurden die Sphäroide mittels der Liquid-Overlay-Methode hergestellt und 72 h später histologisch und immunhistochemisch analysiert. Die Präparation der Rückenhautkammer für die *in vivo* Versuche erfolgte ebenfalls an Tag -3.

Nach 72 h (Tag 0) wurden die Sphäroide in die Rückenhautkammer transplantiert und direkt danach sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Nach Abschluss der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die Tiere euthanasiert und die transplantierten Sphäroide histologisch und immunhistochemisch analysiert.

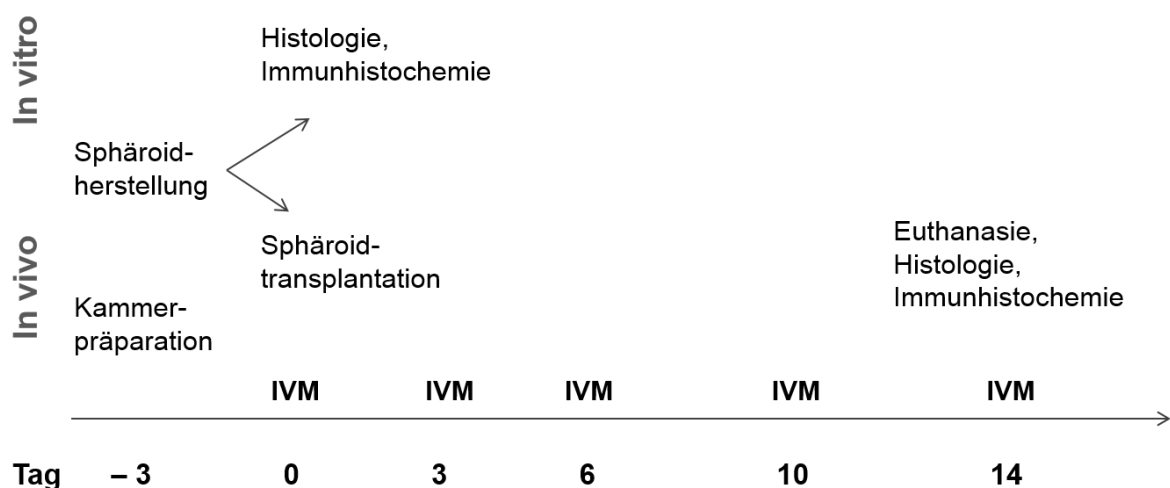


Abb. 10: Schematische Übersicht des Versuchsprotokolls. An Tag -3 fand die Sphäroidherstellung und Kammerpräparation statt. Nach 72 h (Tag 0) wurden die Sphäroide entweder für die *in vitro* Analysen fixiert oder in die Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen transplantiert und mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (IVM; Tag 0, 3, 6, 10 und 14) untersucht. An Tag 14 wurden die Sphäroide und das umliegende Kammergewebe exzidiert, um histologisch und immunhistochemisch weiter analysiert zu werden.

Für die *in vivo* Versuchsdurchführung wurden 32 Tiere in vier Gruppen à acht Tiere eingeteilt. Mono-Kultur-Sphäroide aus HOB (100%) und HDMEC (100%) dienten als Kontrollgruppen und wurden mit Ko-Kultur-Sphäroiden aus HOB-HMDEC (50% / 50%) und HOB-HDMEC-NHDF (50% / 25% / 25%) verglichen.

5.6 Statistik

Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen an den einzelnen Untersuchungstagen mittels „one way analysis of variance“ (ANOVA) gefolgt vom Student-Newman-Keuls-Test als post-hoc-Methode zur Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni (Sigma Stat; Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Falls eine Normalverteilung der Werte ausgeschlossen werden konnte, erfolgte der Gruppenvergleich mit der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse gefolgt von der Dunn's Methode.

Eine statistische Signifikanz wurde bei einem Wert von $p < 0,05$ festgesetzt. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) angegeben. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte durch das Programm Sigma Plot (Jandel Corporation).

6. Ergebnisse

6.1 Zelluläre Organisation und apoptotischer Zelltod frisch generierter Sphäroide

Durch die Liquid-Overlay-Methode war es möglich, dreidimensionale Mono-Kultur-Sphäroide, bestehend aus HOB oder HDMEC, und Ko-Kultur-Sphäroide, bestehend aus HOB-HDMEC oder HOB-HDMEC-NHDF, unter standardisierten Bedingungen herzustellen. Nach 72 h waren die Sphäroide stabil und stellten sich als homogene, runde Zellaggregate dar. Zu diesem Zeitpunkt wurden sie entweder direkt histologisch und immunhistochemisch analysiert oder in die Rückenhautkammern von CD1 Nu/Nu-Mäusen transplantiert.

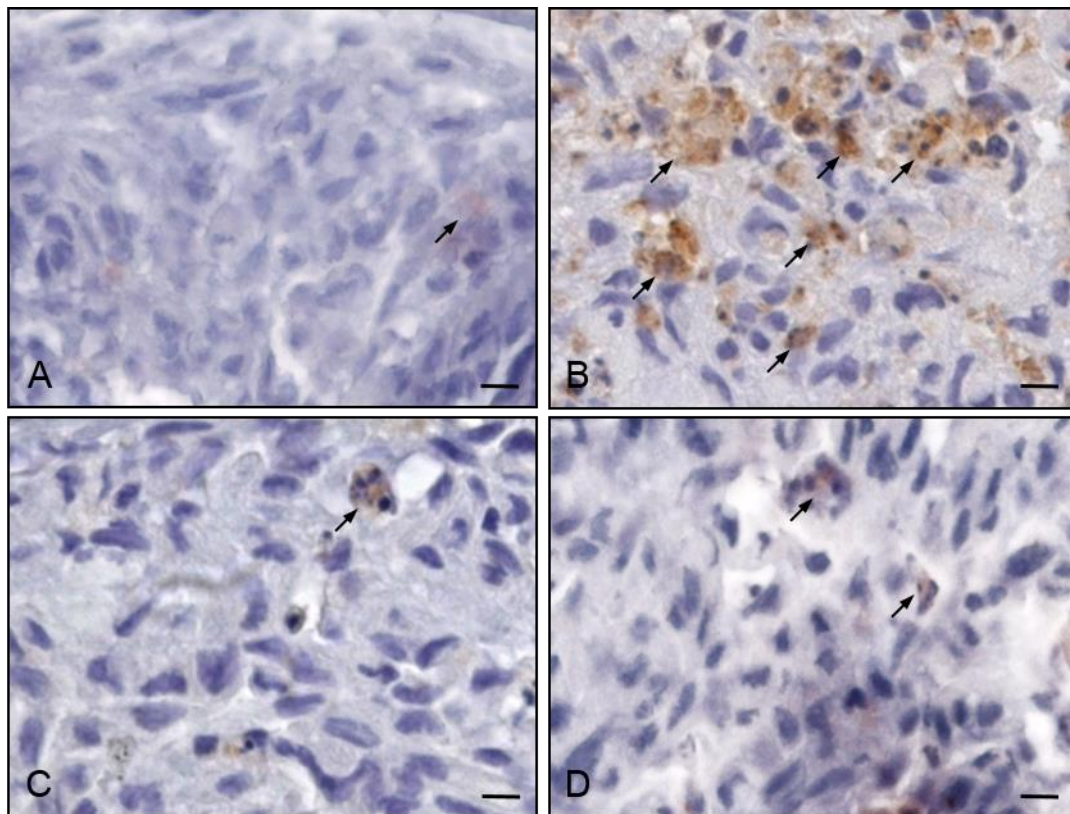


Abb. 11: Mikroskopische Aufnahme eines cleaved Caspase-3-gefärbten HOB-Mono-Kultur-Sphäroids (A), HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroids (B), HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroids (C) und HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroids (D) 72 h nach Herstellung mit der Liquid-Overlay-Methode. Auffallend ist, dass das HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroid signifikant mehr apoptotische Zellen (B, Pfeile) aufweist als alle anderen Sphäroidtypen (A, C, D, Pfeile). Maßstab: 6,5 μ m.

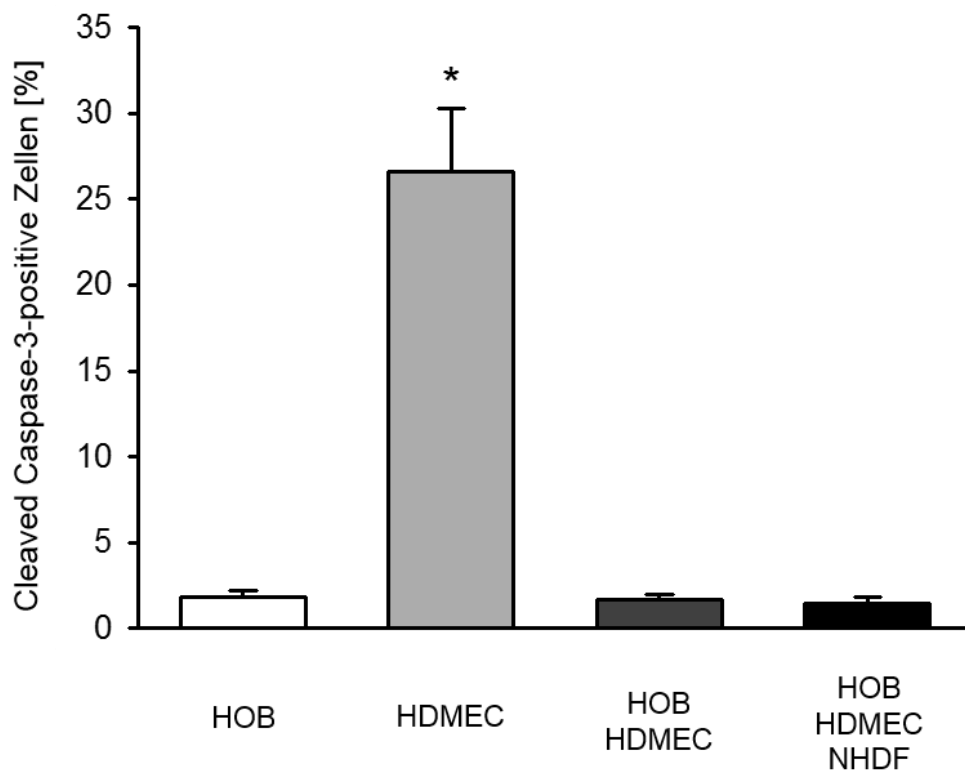


Abb. 12: Anzahl cleaved Caspase-3-positiver Zellen (%) innerhalb von HOB-Mono-Kultur-Sphäroiden (weißer Balken, $n = 8$), HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroiden (hellgrauer Balken, $n = 7$), HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroiden (dunkelgrauer Balken, $n = 7$) und HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroiden (schwarzer Balken, $n = 5$). Mittelwert \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. HOB, HOB-HDMEC und HOB-HDMEC-NHDF.

Die immunhistochemische Detektion apoptotischer Zellen mittels cleaved Caspase-3-Färbung ergab, dass HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroide die signifikant höchste Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu den anderen Sphäroidtypen aufweisen (Abb. 11 B, Abb. 12). Dies zeigt deutlich, dass HDMEC-Sphäroide sehr viel anfälliger für apoptotischen Zelltod sind als HOB-Mono-Kultur-Sphäroide. Darüber hinaus könnte die Kombination von HDMEC mit HOB oder HOB-NHDF in Ko-Kultur-Sphäroiden eine effiziente Strategie sein, um die Apoptose-Rate der HDMEC zu reduzieren (Abb. 11 C-D, Abb. 12).

Die zelluläre Organisation der Sphäroide wurde *in vitro* mit Antikörpern gegen humanes CD31 analysiert. Wie erwartet, enthielten HOB-Mono-Kultur-Sphäroide keine humanen CD31-positiven Zellen (Abb. 13 A-C), wohingegen alle untersuchten Zellen in HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroiden den Endothelzellmarker CD31 exprimierten (Abb. 13 D-F). Beide Ko-Kultur-Sphäroide enthielten humane CD31-positive HDMEC, welche im Gegensatz zu den HDMEC-Sphäroiden in Mono-Kultur (Abb. 13 D-F) in der Lage waren, sich in einem dichten Netzwerk tubulärer, Gefäß-ähnlicher Strukturen zu organisieren (Abb. 13 G-L). Hierbei konnte kein Unterschied zwischen den beiden Ko-Kultur-Sphäroidtypen beobachtet werden.

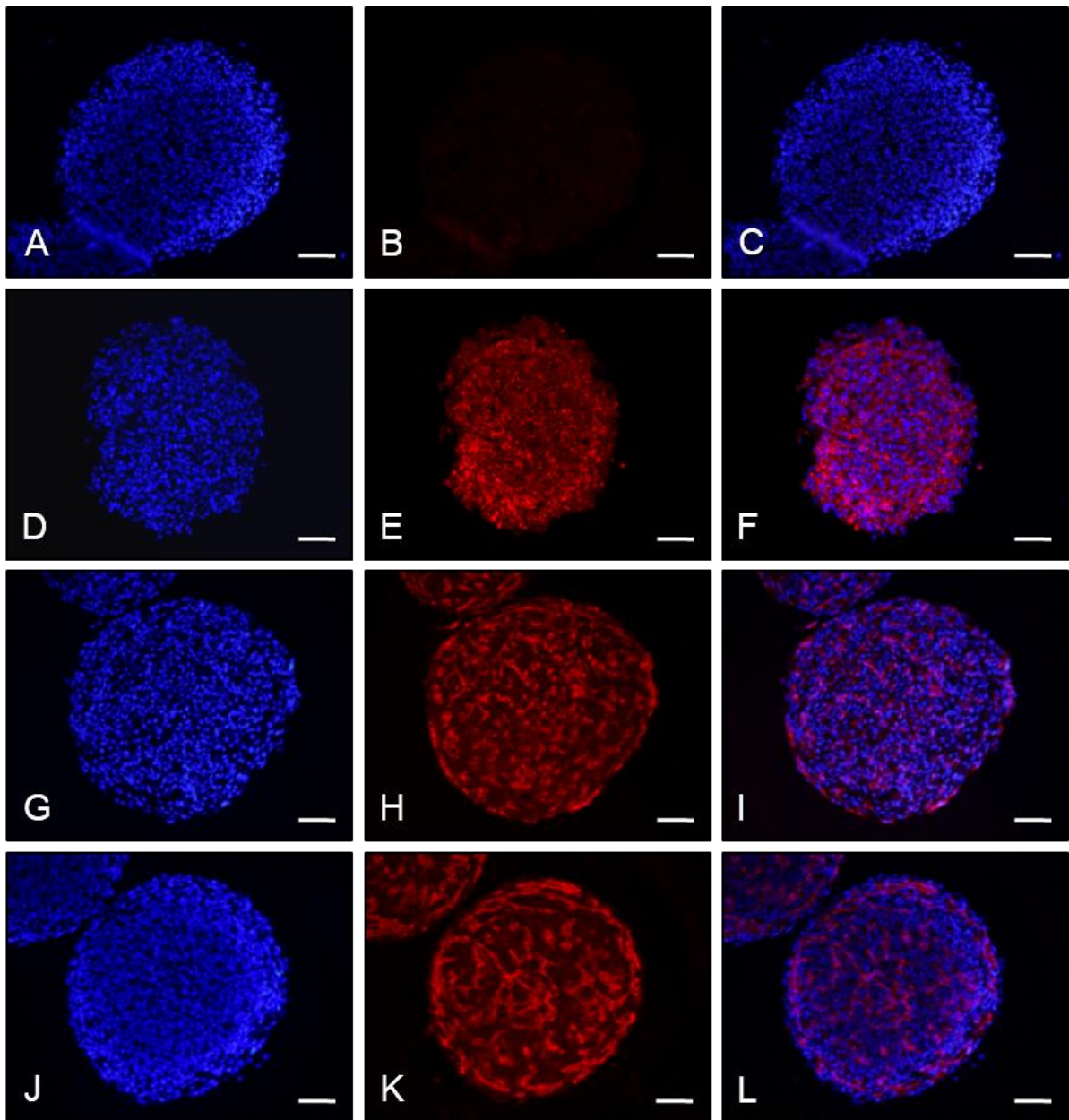


Abb. 13: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HOB-Mono-Kultur-Sphäroiden (A-C), HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroiden (D-F), HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroiden (G-I) und HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroiden (J-L) 72 h nach Herstellung mit der Liquid-Overlay-Methode. Die histologischen Schnitte wurden mit Bisbenzimid (A, D, G, J, blau) zur Identifizierung der Zellkerne und mit einem Antikörper gegen humanes CD31 (B, E, H, K, rot) gefärbt. C, F, I und L sind Kombinationsaufnahmen aus (A, B), (D, E), (G, H) und (J, K). Maßstab: 110 µm.

6.2 Mikrozirkulation der Rückenhautkammer

Mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie konnten die Gefäße der Rückenhautkammer durch intravenöse Gabe von FITC-Dextran an den Beobachtungstagen kontrastreich dargestellt werden. Auf Grund des hohen Molekulargewichtes von 150.000 Da zeichnet sich FITC-Dextran unter physiologischen Bedingungen durch eine geringe Extravasation aus, weshalb die Mikrogefäße vom umliegenden Gewebe leicht abzugrenzen waren.

Das physiologische Gefäßsystem des Gewebes in der Rückenhautkammer besteht aus terminalen Arteriolen, welche aus der A. circumflexa iliaca und der A. thoracica lateralis hervorgehen und sich in nutritive Kapillaren verzweigen. Diese gehen in postkapillare Venolen und Sammelvenolen über. Terminale Arteriolen (Durchmesser $\sim 15\text{-}50\ \mu\text{m}$) zeichnen sich in der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie durch einen geradlinigen Verlauf, eine glatte Wandstruktur sowie eine hohe Blutflussgeschwindigkeit aus. Innerhalb der Rückenhautkammer versorgen sie und ihre Aufzweigungen das nutritive Kapillarbett mit oxygeniertem Blut und Nährstoffen. Die Kapillaren (Durchmesser $\sim 4\text{-}9\ \mu\text{m}$) sind parallel zueinander in einem Abstand von ca. $40\text{-}60\ \mu\text{m}$ angeordnet und durch Querverbindungen miteinander verbunden [Lehr et al., 1993; Laschke et al., 2011]. Nachdem in den Kapillaren der Sauerstoffaustausch stattgefunden hat, wird das sauerstoffarme Blut über postkapillare Venolen (Durchmesser $\sim 20\text{-}40\ \mu\text{m}$) und Sammelvenolen (Durchmesser $\sim 40\text{-}120\ \mu\text{m}$) drainiert [Lehr et al., 1993]. Mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie können die Venolen anhand ihrer Flussrichtung, der unregelmäßigen Wandstruktur und des langsameren Blutflusses leicht von terminalen Arteriolen unterschieden werden [Lehr et al., 1993].

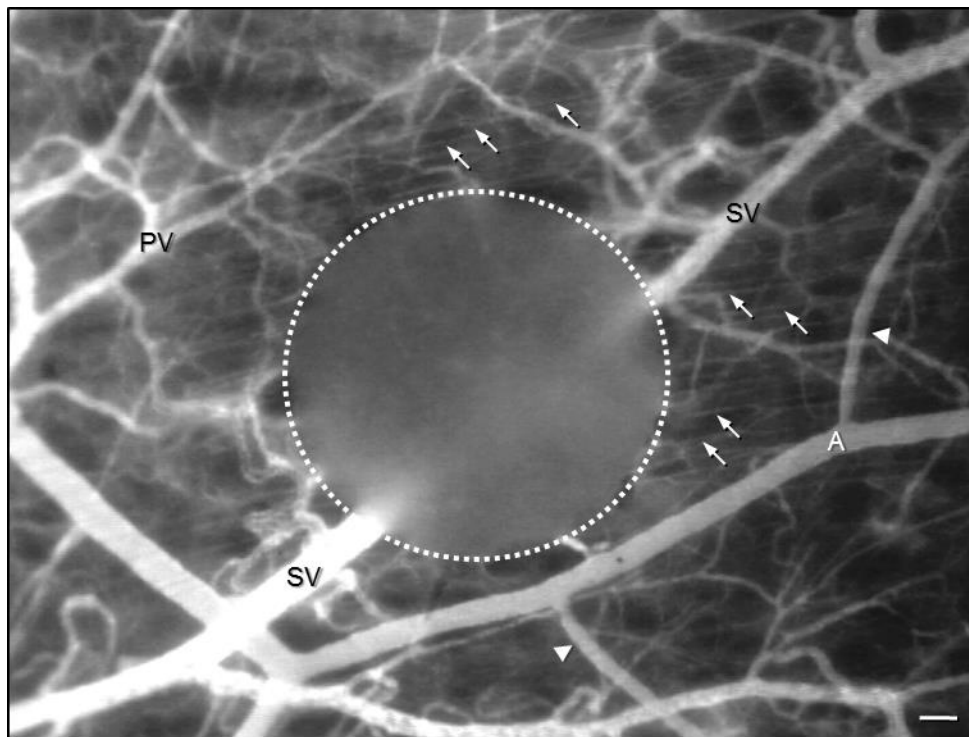


Abb. 14: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Rückenhautkammer einer CD1 Nu/Nu-Maus nach Transplantation eines Sphäroids (gestrichelter Kreis). Arteriolen (A) zweigen sich in terminale Arteriolen (►) auf und versorgen die Kapillaren (Pfeile), welche direkt an ihrem streng parallelen Verlauf in einem Abstand von ca. $40\text{-}60\ \mu\text{m}$ zu erkennen sind. Postkapillare Venolen (PV) münden in Sammelvenolen (SV). Direkt nach Transplantation in die Rückenhautkammer (Tag 0) ist das Sphäroid (gestrichelter Kreis) vom murinen Gewebe leicht abzugrenzen. Fluoreszenzaufnahme bei einer Anregungswellenlänge von $450\text{-}490\ \text{nm}$ (Blau-Filter) mit Kontrastverstärkung durch FITC-Dextran 150.000 i.v.. Maßstab: $60\ \mu\text{m}$.

Nach Transplantation in die Rückenhautkammer ließen sich die mit Bisbenzimid-gefärbten Sphäroide leicht vom Empfängergerewebe abgrenzen, da sie auf Grund ihres hellen Fluoreszenzsignals bei einer Anregungswellenlänge von 330-390 nm (UV-Filter) detektiert werden konnten (Abb. 15 A-D).

6.3 Größe und apoptotischer Zelltod transplanterter Sphäroide

Bei der Analyse der Sphäroidgröße zeigte sich interessanterweise eine Größenzunahme zwischen Tag 0 und Tag 14 bei den HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroiden (Abb. 15, Abb. 16). Die anderen Gruppen hingegen wiesen keine Veränderung der Sphäroidgröße auf. Die Färbung mit Bisbenzimid erlaubte zusätzlich die Quantifizierung apoptotischer Zellen innerhalb der Sphäroide (Abb. 17 A-D). Diese konnten durch eine erhöhte Kondensation und Fragmentierung des Chromatins identifiziert werden.

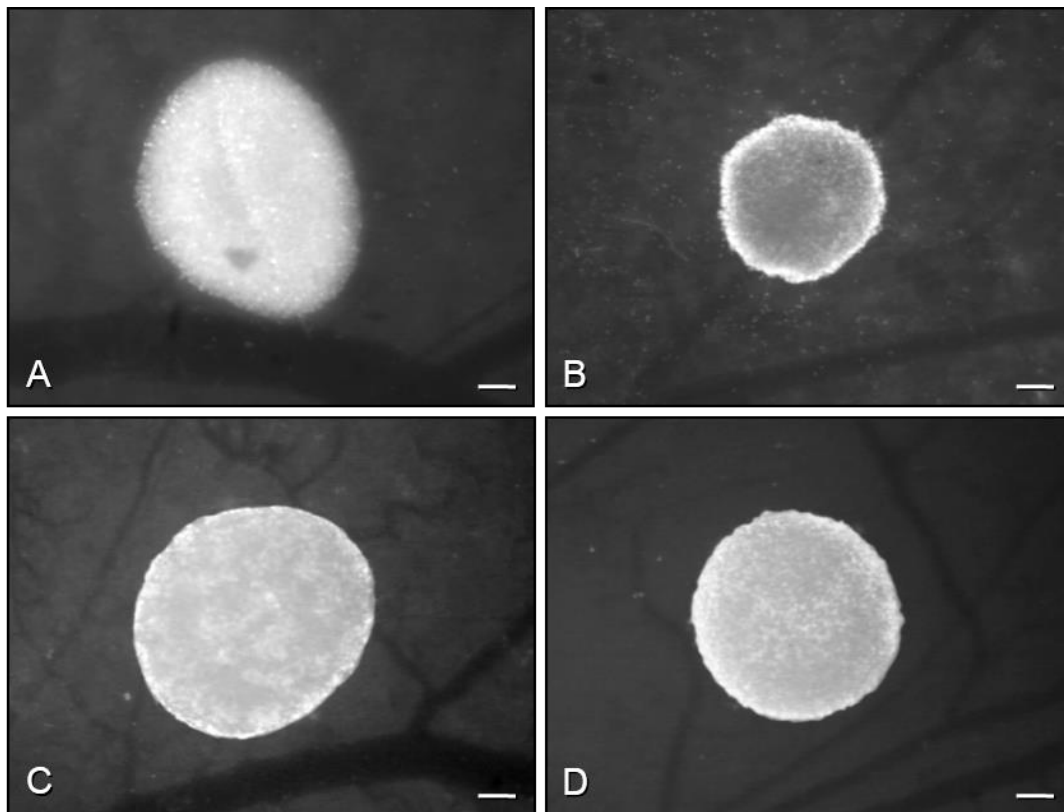


Abb. 15: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines HOB-Mono-Kultur-Sphäroids (A), HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroids (B), HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroids (C) und eines HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroids (D) direkt nach Transplantation in die Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen. Die Bisbenzimid-gefärbten Sphäroide können in allen vier Gruppen leicht vom nicht-gefärbten, murinen Kammergerewebe auf Grund ihres hellen Fluoreszenzsignals bei einer Anregungswellenlänge von 330-390 nm (UV-Filter) 72 h nach Herstellung abgegrenzt werden. Maßstab: 120 μ m.

Passend zu den immunhistochemischen Ergebnissen (Abb. 12) konnte im Vergleich zu den anderen Gruppen eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen direkt und drei Tage nach Transplantation in HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroiden festgestellt werden (Abb. 17 A-D, Abb. 18). An Tag 14 wurden die in die Rückenhautkammer transplantierten Sphäroide immunhistochemisch analysiert, um apoptotische Zellen mittels cleaved Caspase-3-Färbung darzustellen. Zu diesem Zeitpunkt konnte vergleichbar zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen an Tag 0 und 3 kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen HOB, HOB-HDMEC und HOB-HDMEC-NHDF gefunden werden (HOB: $2,7 \pm 1,0\%$; HOB-HDMEC: $1,5 \pm 0,5\%$ und HOB-HDMEC-NHDF: $3,8 \pm 1,3\%$). Eine Auswertung der cleaved Caspase-3-gefärbten HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroide war nicht möglich, da die Sphäroide stark zerfallen waren.

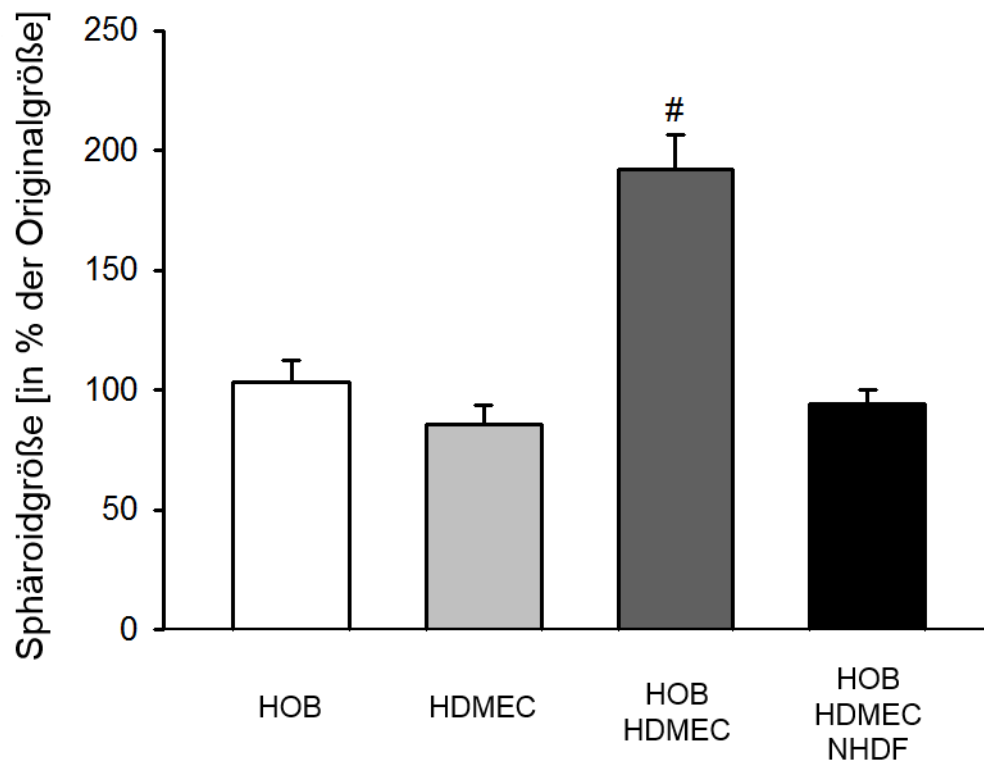


Abb. 16: Sphäroidgröße 14 Tage nach Transplantation in % der Originalgröße an Tag 0. HOB-Mono-Kultur-Sphäroide (weißer Balken), HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroide (hellgrauer Balken), HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroide (dunkelgrauer Balken) und HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroide (schwarzer Balken). Mittelwert \pm SEM. [#] $p < 0,05$ vs. HOB, HDMEC und HOB-HDMEC-NHDF.

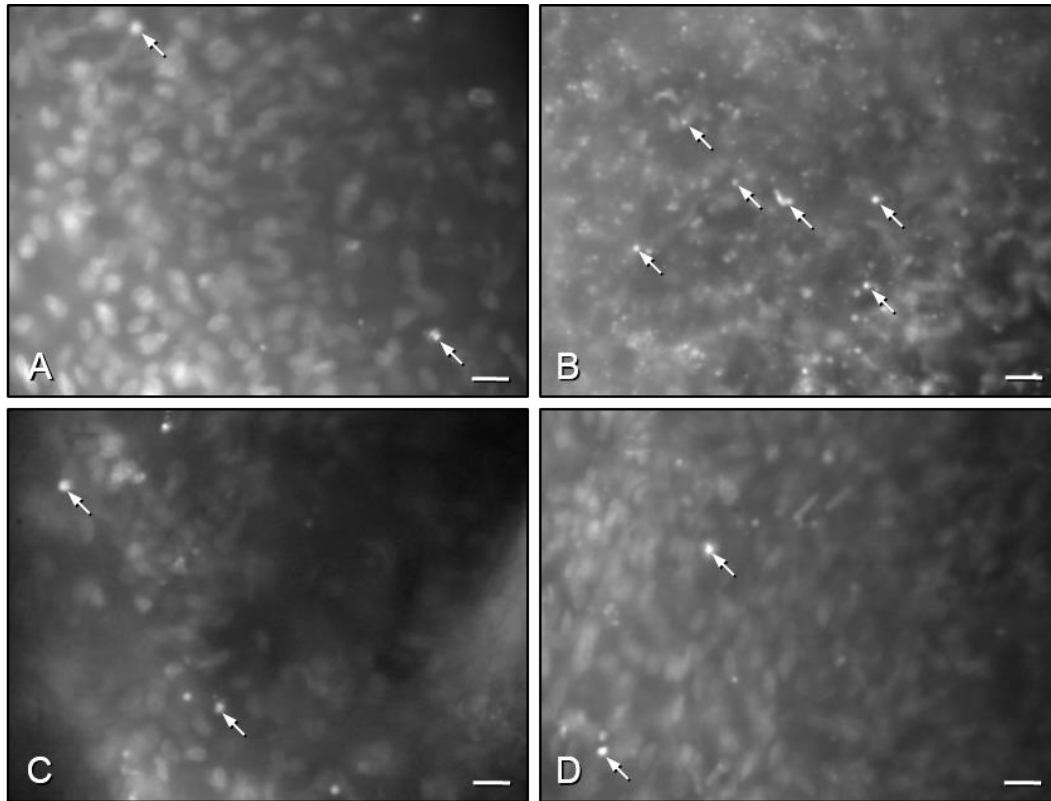


Abb. 17: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines HOB-Mono-Kultur-Sphäroids (A), HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroids (B), HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroids (C) und eines HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroids (D) drei Tage nach Transplantation in die Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen. Die Bisbenzimid-Färbung ermöglicht in 50x Vergrößerung eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen, welche durch eine erhöhte Kondensation und Fragmentierung des Chromatins (A-D, Pfeile) bei einer Anregungswellenlänge von 330-390 nm (UV-Filter) identifiziert werden können. Maßstab: 17 μ m.

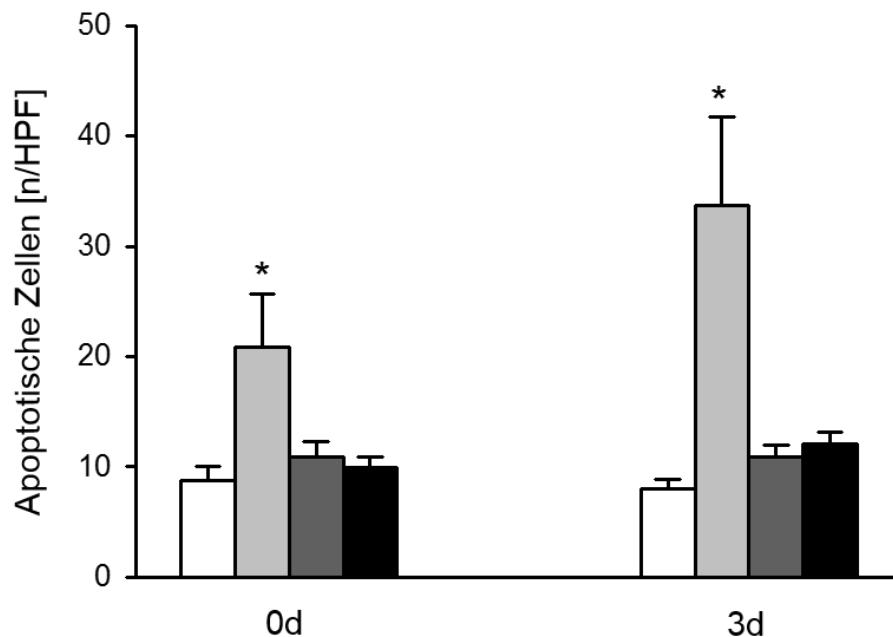


Abb. 18: Anzahl apoptotischer Zellen (n/HPF) innerhalb der Sphäroide direkt (Tag 0) sowie drei Tage nach Transplantation in die Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen. HOB-Mono-Kultur-Sphäroide (weißer Balken), HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroide (hellgrauer Balken), HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroide (dunkelgrauer Balken) und HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroide (schwarzer Balken). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. HOB.

6.4 Vaskularisierung transplanterter Sphäroide

Die repetitiven lichtmikroskopischen Übersichtsaufnahmen und die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erlaubten eine Beurteilung der Vaskularisierung der transplantierten Sphäroide. Im Verlauf der Experimente konnte bei den lichtmikroskopischen Kammerübersichtsaufnahmen in allen Sphäroidtypen, welche HDMEC enthielten, eine zunehmende rötliche Färbung beobachtet werden (Abb. 19). Zusätzlich wurden in denselben Sphäroidtypen tubuläre, Gefäß-ähnliche Strukturen mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen, obwohl dies für HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroide *in vitro* nicht belegt werden konnte (siehe auch Abb. 13). Da diese Strukturen zum Zeitpunkt der mikroskopischen Beobachtung zum Teil nicht mit FITC-Dextran-markiertem Blutplasma perfundiert waren, erschienen sie bei einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm (Blau-Filter) schwarz (Abb. 20). Auf Grund der intraluminalen Erythrozyten kam es jedoch makroskopisch zu einer zunehmenden rötlichen Färbung der Sphäroide (Abb. 19). Zusätzlich erfolgte eine histologische und immunhistochemische Analyse der Sphäroide 14 Tage nach Transplantation in die Rückenhautkammer, welche unspezifisch gefärbte Erythrozyten innerhalb der Sphäroide nachweisen konnte (Abb. 21).

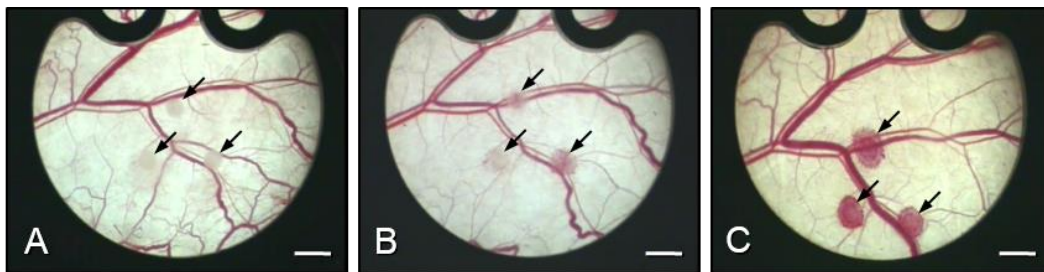


Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroiden (Pfeile) direkt (A), 3 Tage (B) und 14 Tage (C) nach Transplantation in die Rückenhautkammer einer CD1 Nu/Nu-Maus. Auffallend ist, dass die Sphäroide sich zunehmend rötlich anfärben. Maßstab: 1,3 mm.

Wie erwartet, konnte keine intrinsische Vaskularisierung in der Gruppe der HOB-Mono-Kultur-Sphäroide beobachtet werden, da diese keine Endothelzellen enthielten (Abb. 20 A, Abb. 22). Im Gegensatz dazu konnte in allen Sphäroidtypen, welche HDMEC enthielten, eine Zunahme des semiquantitativen Scores, welcher die intrinsische Vaskularisierung über den 14-tägigen Beobachtungszeitraum erfasste, festgestellt werden (Abb. 20 B-D, Abb. 22; siehe auch Abb. 9). Interessanterweise zeigten HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroide die größte Zunahme des semiquantitativen Scores (Abb. 22). Einzelne Sphäroide dieser Gruppe waren in der Lage, zwischen Tag 6 und 14 nach Transplantation eine intrinsische Vaskularisierung über ihre Grenzen hinaus zu entwickeln. So konnten humane Gefäße innerhalb des murinen M. panniculus carnosus nachgewiesen werden (Abb. 20 C, Abb. 23).

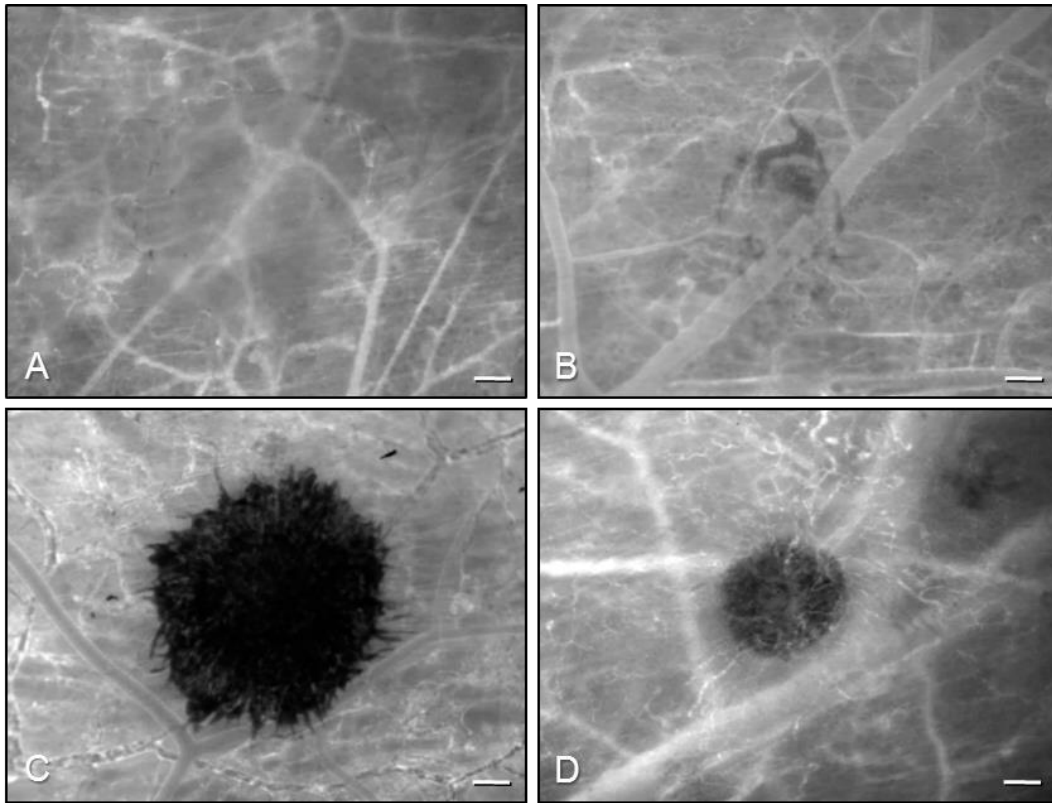


Abb. 20: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines HOB-Mono-Kultur-Sphäroids (A), HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroids (B), HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroids (C) und eines HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroids (D) 14 Tage nach Transplantation in die Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen. Fluoreszenzaufnahme bei einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm (Blau-Filter) mit Kontrastverstärkung durch FITC-Dextran 150.000 i.v.. Während bei dem HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroid (C) die Vaskularisierung die Sphäroidfläche überschreitet, zeigt der HOB-Mono-Kultur-Sphäroid (A) kein Anzeichen einer intrinsischen Vaskularisierung. Die Sphäroidfläche des HOB-HDMEC-NHDF-Sphäroids (D) ist vollständig perfundiert, was durch das FITC-Dextran-markierte Blutplasma leicht zu erkennen ist. Maßstab: 120 μ m.

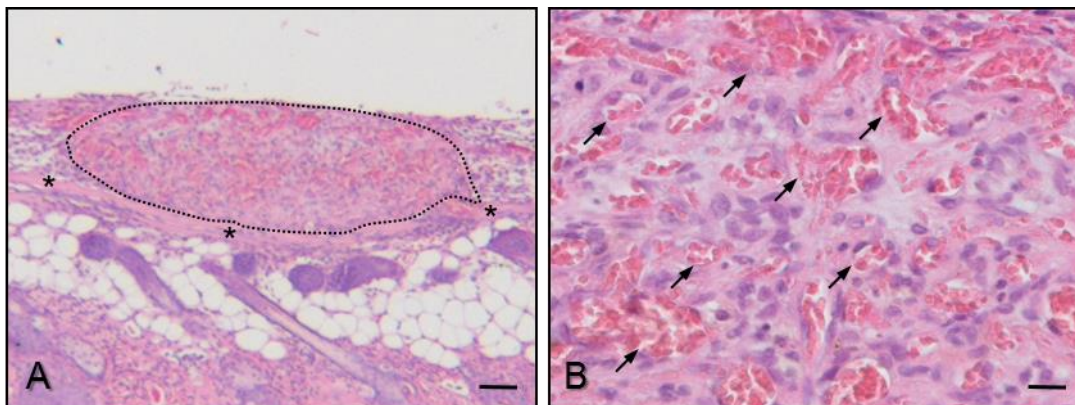


Abb. 21: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines HE-gefärbten HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroids 14 Tage nach Transplantation auf den murinen *M. panniculus carnosus* (Sterne) der Rückenhautkammer einer CD1 Nu/Nu-Maus. Die Sphäroidgrenzen sind mit einer gestrichelten Linie markiert (A). Ein vergrößerter Ausschnitt (B) zeigt viele gefärbte Erythrozyten (Pfeile) innerhalb des Sphäroids. Maßstab: A: 130 μ m; B: 40 μ m.

Analog hierzu ergaben die Ergebnisse der Perfusionsanalysen 14 Tage nach Transplantation in die Rückenhautkammer, dass HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroide die höchste Anzahl FITC-Dextran-perfundierter Mikrogefäße ($48,0 \pm 13,9\%$) im Vergleich zu HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroiden ($20,8 \pm 12,5\%$) und HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroiden ($10,0 \pm 7,9\%$) zeigten. Im Gegensatz zu den anderen Sphäroidgruppen konnten in HOB-Mono-Kultur-Sphäroiden keine FITC-Dextran-perfundierten Mikrogefäße nachgewiesen werden.

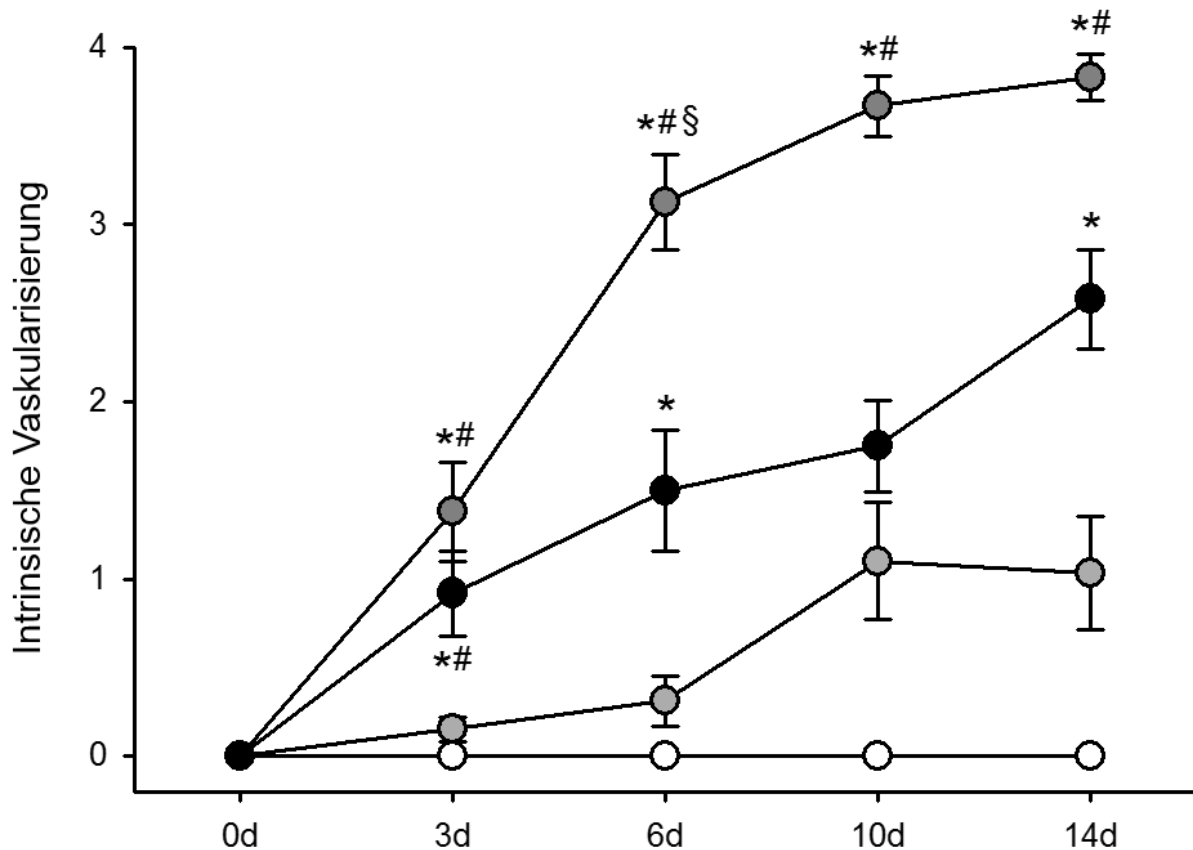


Abb. 22: Intrinsische Vaskularisierung (erfasst mittels eines semiquantitativen Scores, siehe auch Abb. 9) von HOB-Mono-Kultur-Sphäroiden (weiße Kreise), HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroiden (hellgraue Kreise), HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroiden (dunkelgraue Kreise) und HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroiden (schwarze Kreise) direkt nach Transplantation (Tag 0) sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer bei einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm (Blau-Filter). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. HOB; # $p < 0,05$ vs. HDMEC; § $p < 0,05$ vs. HOB-HDMEC-NHDF.

Außerdem wurden die Sphäroide 14 Tage nach Transplantation mittels anti-humanen und anti-murinen Antikörpern gegen den Endothelzellmarker CD31 angefärbt, um den Ursprung der Mikrogefäße zu analysieren. In Übereinstimmung zu den Ergebnissen der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 20 A, Abb. 22) wiesen HOB-Mono-Kultur-Sphäroide die geringste Dichte an Mikrogefäßen auf ($32 \pm 24 \text{ mm}^{-2}$; Abb. 23 A, B), welche alle murinen Ursprungs waren.

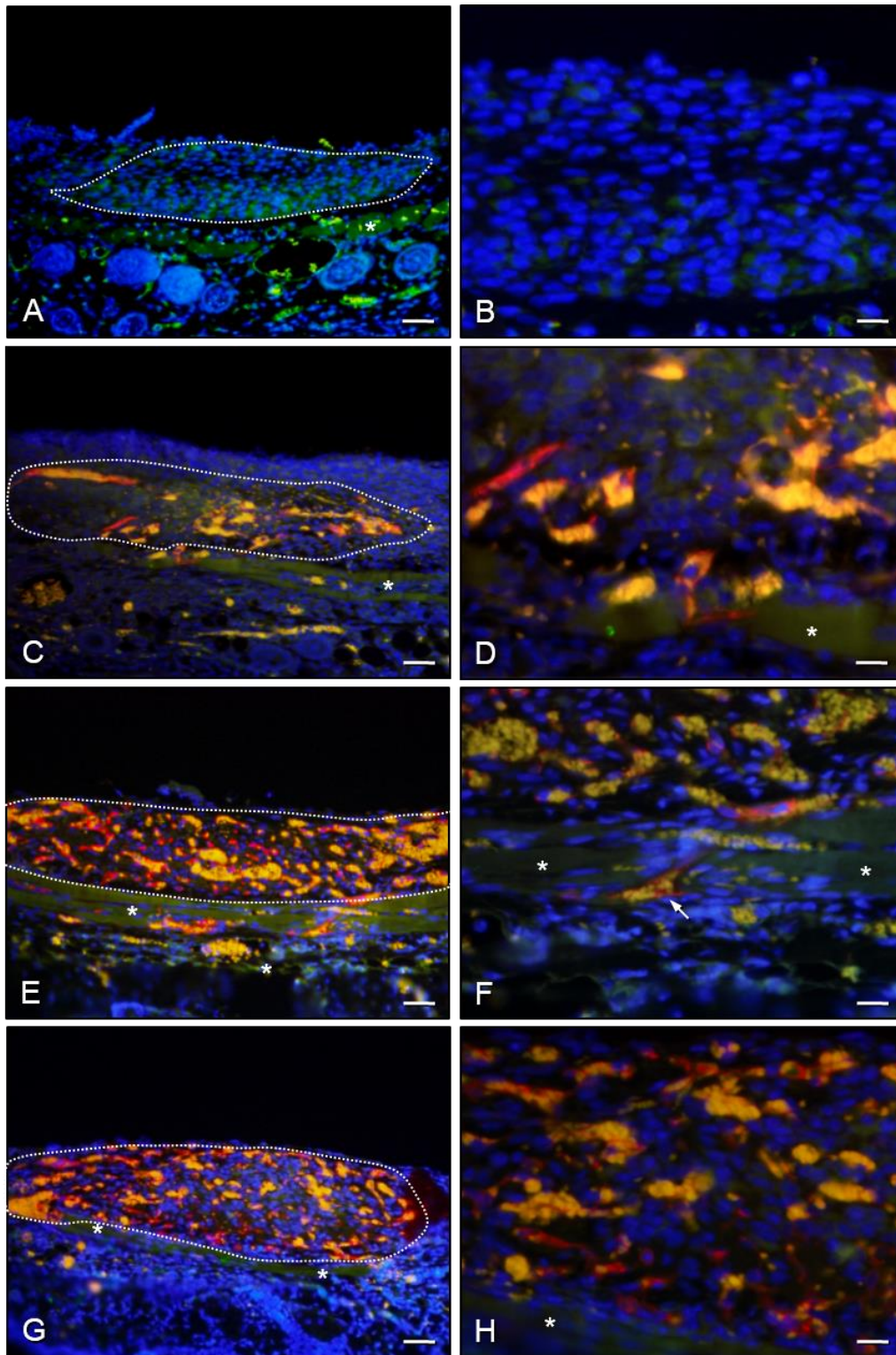


Abb. 23: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines HOB-Mono-Kultur-Sphäroids (**A, B**), HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroids (**C, D**), HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroids (**E, F**) und eines HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroids (**G, H**) 14 Tage nach Transplantation auf den murinen *M. panniculus carnosus* (Sterne) der Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen. Die Sphäroidgrenzen sind jeweils mit einer gestrichelten Linie markiert (**A, C, E, G**). Die Schnitte wurden mit Bisbenzimid zur Identifizierung der Zellkerne (blau), mit einem Antikörper gegen humanes CD31 (rot) und mit einem Antikörper gegen murines CD31 (grün) gefärbt. Auffallend ist, dass alle Sphäroide, welche HDMEC enthalten (**C-H**), tubuläre, Gefäß-ähnliche Strukturen humanen Ursprungs (rot) ausbilden und mit unspezifisch gefärbten Erythrozyten (gelb-orange) ausgefüllt sind. Der Pfeil in **F** markiert ein humanes Mikrogefäß, welches in die quergestreifte murine Muskulatur (Sterne) einwächst. Maßstab: **A, C, E, G**: 130 µm; **B, D, F, H**: 40 µm.

Wie erwartet, enthielten HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroide hauptsächlich Mikrogefäße humanen Ursprungs mit einer Dichte von $93 \pm 57 \text{ mm}^{-2}$. Nur in wenigen Fällen konnten Mikrogefäße murinen Ursprungs nachgewiesen werden ($8 \pm 6 \text{ mm}^{-2}$; Abb. 23 C, D). Beide Ko-Kultur-Sphäroidgruppen zeigten eine vergleichbar niedrige Dichte an Mikrogefäßen murinen Ursprungs (HOB-HDMEC: $3 \pm 3 \text{ mm}^{-2}$ und HOB-HDMEC-NHDF: $6 \pm 2 \text{ mm}^{-2}$). Diese Sphäroide zeichneten sich jedoch durch eine deutlich höhere Dichte von $564 \pm 165 \text{ mm}^{-2}$ (HOB-HDMEC) und $452 \pm 83 \text{ mm}^{-2}$ (HOB-HDMEC-NHDF) an Mikrogefäßen humanen Ursprungs (Abb. 23 E-H) im Vergleich zu HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroiden (Abb. 23 C, D) aus. Interessanterweise war das Lumen der humanen Mikrogefäße in den drei HDMEC-enthaltenen Sphäroidgruppen mit Erythrozyten gefüllt. Dies bedeutet, dass die humanen Mikrogefäße Verbindungen mit dem murinen Gefäßsystem herstellten (Inoskulation) und dass diese perfundiert wurden (Abb. 23 C-H). Zusätzlich konnten einige Mikrogefäße humanen Ursprungs außerhalb des Sphäroids detektiert werden (Abb. 23 F).

6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des Modells der Rückenhautkammer in Kombination mit der Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Vaskularisierung von Mono- und Ko-Kultur-Sphäroiden für das Knochen-Tissue-Engineering untersucht werden. Dabei zeigte sich folgendes:

- Die höchste *in vitro* Apoptose-Rate weisen 72 h nach Herstellung HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroide auf. Interessanterweise kann bei Ko-Kultivierung der Endothelzellen mit HOB oder HOB-NHDF die Anzahl apoptotischer Zellen stark reduziert werden. Direkt und an Tag 3 nach Transplantation der Sphäroide in die Rückenhautkammer zeigen sich vergleichbare Ergebnisse.
- Bei Ko-Kultivierung von HDMEC mit HOB oder HOB-NHDF bilden sich bereits 72 h nach Herstellung der Sphäroide *in vitro* tubuläre, Gefäß-ähnliche Strukturen aus. Mono-Kultur-Sphäroide sind hierzu nicht fähig.
- 14 Tage nach Transplantation in die Rückenhautkammer zeigen lediglich HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroide eine Größenzunahme. Mono-Kultur-Sphäroide und die Ko-Kultivierung von HOB, HDMEC und NHDF verändern im Verlauf des Experiments ihre Größe nicht.
- Das *in vitro* präformierte, Gefäß-ähnliche Netzwerk humanen Ursprungs, welches HDMEC-enthaltende Ko-Kultur-Sphäroide ausbilden, ist in der Lage, nach Transplantation in die Rückenhautkammer mit dem Empfängergefäßsystem Verbindungen einzugehen. Ko-Kultur-Sphäroide zeichnen sich durch ein deutlich höheres angiogenes Potential im Vergleich zu Mono-Kultur-Sphäroiden aus.

7. Diskussion

7.1 Diskussion von Material und Methoden

7.1.1 Diskussion des Modells

Für den klinischen Alltag werden zur Therapie von großen Knochendefekten Alternativen zu herkömmlichen Knochenersatzmaterialien gesucht. In dieser Arbeit wurden dreidimensionale Sphäroide als potentielle Vaskularisierungseinheiten für das Tissue Engineering von Knochen näher untersucht. Hierzu wurde ein Tiermodell eingesetzt, bei dem immuninkompetenten CD1 Nu/Nu-Mäusen Sphäroide in die Rückenhautkammer transplantiert wurden. Die Sphäroide konnten im Verlauf mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie, Histologie und Immunhistochemie analysiert werden. Die Verwendung von immuninkompetenten CD1 Nu/Nu-Mäusen ermöglicht die *in vivo* Untersuchung von xenogenen (z. B. humanen) Geweben [Lehr et al., 1993; Menger et al., 2002], da diese Mäuse keinen Thymus und somit auch keine T-Helferzellen besitzen, welche für eine akute Abstoßungsreaktion verantwortlich sind [Benichou et al., 2011; Murphy et al., 2011].

Das Modell der Rückenhautkammer ist ein etabliertes Modell zur Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Nachdem Sandison 1924 das erste Kammermodell an einem Kaninchenohr etablierte [Sandison, 1928], wurden im Laufe des letzten Jahrhunderts verschiedene Kammermodelle entwickelt und sind inzwischen bei Ratte, Hamster und Maus eingesetzt [Algire, 1943; Hobbs et al., 1976; Endrich et al., 1980; Lehr et al., 1993; Laschke et al., 2011]. Heutzutage wird die Rückenhautkammer z. B. zur Analyse von Knochenersatzmaterialien [Ring et al., 2011], Scaffolds [Carletti et al., 2011], prothetischen Gefäßtransplantaten [Bonhomme et al., 2010] oder Metallimplantaten [Hauser et al., 2009] verwendet.

Die Rückenhautkammer zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass repetitive Analysen über einen Zeitraum von zwei bis drei Wochen am lebenden Tier durchgeführt und unter anderem Wachstum und Vaskularisierung von Transplantaten oder Implantaten mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie quantitativ ausgewertet werden können [Menger und Lehr, 1993; Laschke et al., 2011]. Das Modell eignet sich ideal für die Transplantation von zu untersuchenden Geweben, wie z. B. Sphäroiden, Ovarial-Follikeln oder Tumoren, da das Deckglas sehr einfach zu entfernen ist [Laschke et al., 2011]. Nachteil der Rückenhautkammer ist ein relativ kleines Beobachtungsfeld (Durchmesser ~ 10 mm), was die Größe der Transplantate begrenzt [Laschke et al., 2011]. In den Versuchen der

vorliegenden Arbeit wurden jeweils drei Sphäroide in Form eines gleichseitigen Dreiecks mit großem Abstand zueinander in eine Rückenhautkammer transplantiert, um möglichst eine gegenseitige Beeinflussung der Sphäroide zu vermeiden. Um den Einfluss der Kammerpräparation auf die sich anschließenden mikrozirkulatorischen Untersuchungen so gering wie möglich zu halten, erfolgte die Transplantation der Sphäroide und der Untersuchungsbeginn erst 72 h nach Präparation [Lehr et al., 1993]. Durch die Verwendung von Titan als Kammermaterial wurde die physische Belastung für die Tiere reduziert, da sich Titan durch ein geringes Gewicht bei hoher Stabilität und Biokompatibilität auszeichnet [Menger et al., 1990].

Nach Ende der Versuche konnte das Kammergewebe zur histologischen und immunhistochemischen Weiterverarbeitung entnommen werden. Dies ermöglichte in der vorliegenden Arbeit eine quantitative Beurteilung des apoptotischen Zelltodes und der humanen und murine Gefäßdichte in den transplantierten Sphäroiden.

7.1.2 Diskussion der Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden die Sphäroide 72 h nach Generierung entweder für weitere *in vitro* Analysen histologisch oder immunhistochemisch weiterverarbeitet oder in die Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen transplantiert. Die Verwendung und Expansion der humanen Primärzellen in einer Masterzellbank schaffte Reproduzierbarkeit und standardisierte Bedingungen. Metzger et al. [2011] verglichen verschiedene Herstellungstechniken für Sphäroide. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Hanging-Drop-Technik und Carboxymethyl-Cellulose-Technik mit der Liquid-Overlay-Methode stabile Mono- und Ko-Kultur-Sphäroide aus bis zu drei Zelltypen mit einer festgelegten Zellzahl hergestellt werden können [Metzger et al., 2011]. Weitere Vorteile dieser Methode bestehen in einer hohen Ausbeute an Sphäroiden und reproduzierbaren Anordnung der Zellen [Metzger et al., 2011]. Zudem kann eine vergleichbare Größe der Sphäroide mit einer nur sehr geringen Standardabweichung im Vergleich zu anderen Techniken beobachtet werden [Metzger et al., 2011]. Nur die Liquid-Overlay-Methode erlaubt laut Metzger et al. [2011] die Herstellung von HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroiden im Vergleich zur Hanging-Drop- und Carboxymethyl-Cellulose-Technik.

Sphäroide lassen sich vielseitig einsetzen und dienen unter anderem der Analyse von Tumoren [Wang et al., 2012], der Knochenheilung [Steffens et al., 2009] und der Angiogenese [Laschke et al., 2013]. Als dreidimensionale Strukturen, welche intensive Zell-Zell-Kontakte ermöglichen, können Sphäroide den komplizierten Prozess der Angiogenese in einem Gewebe besser simulieren als eine vergleichbare zweidimensionale Zellkultur [Santini und Rainaldi, 1999; Salgado et al., 2004; Ivascu und Kubbies, 2006; Achilli et al.,

2012]. Sphäroide stellen daher interessante und vielversprechende Einheiten für die Entwicklung von Gewebekonstrukten dar.

Weiterhin kann durch Ko-Kultivierung verschiedener Zellen in den Sphäroiden die physiologische *in vivo* Situation besser simuliert werden [Wenger et al., 2004]. Idealerweise werden im Tissue Engineering von Knochen Sphäroide verwendet, welche aus Zellen des Knochengewebes generiert werden. Hierzu zählen Osteoblasten, Endothelzellen und Matrix-bildende Fibroblasten. Osteoblasten können neuen Knochen synthetisieren und die extrazelluläre Matrix mineralisieren [Schiller et al., 2001]. In dieser Arbeit wurden Osteoblasten mit Endothelzellen ko-kultiviert, da die Ausbildung von Gefäß-ähnlichen Strukturen bei Ko-Kultivierung nachgewiesen werden konnte [Santos et al., 2009]. Beide Zelltypen sind für die Osteogenese und Frakturheilung von großer Bedeutung, da die Vaskularisierung des Knochens für die Knochenfunktionalität und Ossifikation essentiell ist [Wenger et al., 2004; Rouwkema et al., 2006; Steffens et al., 2009]. Endothelzellen bilden die Grundlage neuer Gefäße [Krenning et al., 2009]. Da HDMEC aber in Mono-Kultur keine stabilen Gefäße ausbilden können, ist die Kombination von Endothelzellen mit gewebetypischen Zellen, wie z. B. Osteoblasten, im vorliegenden Ansatz sinnvoll [Unger et al., 2007; Santos et al., 2009; Metzger et al., 2011].

NHDF wurden in dieser Arbeit mit HOB und HDMEC kombiniert, da Fibroblasten positiven Einfluss auf Endothelzellen und Osteoblasten nehmen können. Zum einen können sie in Ko-Kultur die Migration, Lebensfähigkeit und das Potential von Endothelzellen verbessern [Donovan et al., 2001] und Mikrogefäße stabilisieren [Villaschi und Nicosia, 1994; Nicosia et al., 2011]. Zum anderen sind sie eine wichtige Proteinquelle der extrazellulären Matrix [Klingberg et al., 2013], welche Teil des physiologischen Knochens ist.

Nach Transplantation der Sphäroide in die Rückenhautkammer kann die Mikrozirkulation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Alternativ stehen verschiedene *in vivo* Methoden, wie z. B. die Laser-Doppler-Flowmetrie [Arvidsson et al., 1988] oder die Mikrosphären-Technik [Vollmar et al., 1992] zur Verfügung, welche aber nur indirekte Angaben über die Mikrozirkulation ermöglichen [Laschke et al., 2011]. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zusammen mit der Epi-Illuminationstechnik lässt eine direkte Darstellung des Gefäßsystems zu, so dass hier sämtliche Gefäßabschnitte der Rückenhautkammer sowie das sich entwickelnde mikrovaskuläre Netzwerk und die Perfusion Gefäß-ähnlicher Strukturen in den transplantierten Sphäroiden visualisiert werden konnten. Außerdem ist eine repetitive Analyse von zellulären und molekularen Prozessen über das Anfärben der Sphäroide bzw. der Injektion von Fluoreszenzstoffen möglich [Laschke et al., 2011]. Hierbei können z. B. verschiedene Mechanismen des Zelltodes wie z.B. Apoptose [Westermann et al., 1999] und Nekrose [Harris et al., 1997], Veränderungen

der Gefäßpermeabilität [Pries, 1988] und das Fließverhalten von Thrombozyten und Leukozyten [Menger et al., 1992] unterschieden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Sphäroide vor Transplantation in die Rückenhautkammer mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid gefärbt, welche eine Visualisierung der Transplantate bei einer Anregungswellenlänge von 330-390 nm (UV-Filter) in Epi-Illumination ermöglichte. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit zu Beginn jeder intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran in den retrobulbären Venenplexus injiziert. Dieser färbte das Blutplasma an und ermöglichte eine Darstellung der Gefäße bei einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm (Blau-Filter) in Epi-Illumination. Der Fluoreszenzfarbstoff ist potentiell phototoxisch, da Fluorochrome zur Bildung von schädlichen, freien Sauerstoffradikalen angeregt werden können. Mögliche Konsequenzen auf die Mikrozirkulation können Endothelzellschäden [Reed und Miller, 1988], Vasospasmen [Saetzler et al., 1997] und eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung [Herrmann, 1983] sein. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit zur Reduktion solcher Effekte eine geringe Dosierung des Fluoreszenzfarbstoffes sowie eine kurze Mikroskopie-Zeit von ca. 20 Minuten pro Kammer und Untersuchungszeitpunkt gewählt.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnten wesentliche Unterschiede von Ko-Kultur-Sphäroiden gegenüber Mono-Kultur-Sphäroiden gezeigt werden. So wurde *in vitro* und *in vivo* eine niedrigere Apoptose-Rate der Ko-Kultur-Sphäroide festgestellt. Außerdem wiesen Ko-Kultur-Sphäroide eine verbesserte Vaskularisierung und Stabilität im Vergleich zu Mono-Kultur-Sphäroiden auf. Interessanterweise verbesserte die zusätzliche Inkorporation von NHDF die Eigenschaften von HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroiden nicht, so dass nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Ko-Kultivierung von 50% HOB und 50% HDMEC als ideale Sphäroidkombination angesehen werden kann.

Immunhistochemisch wiesen lediglich HDMEC-Mono-Kultur-Sphäroide eine deutlich erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen auf, was zeigt, dass Endothelzellen im Vergleich zu HOB in Mono-Kultur anfälliger den für apoptotischen Zelltod sind. Erstaunlicherweise konnte jedoch bei Ko-Kultivierung von HDMEC mit HOB oder HOB und NHDF die Zahl apoptotischer Zellen stark reduziert werden. Dies deutet daraufhin, dass verschiedene Zelltypen Einfluss auf die Signalkaskaden von Endothelzellen nehmen können, welche das Zellüberleben regulieren [Wenger et al., 2005; Fröhlich et al., 2008]. Steiner et al. [2012] berichten, dass die Proliferationsfähigkeit von Osteoblasten bei direktem Kontakt zu ko-kultivierten Endothelzellen erhöht ist. Außerdem kann die durch Osteoblasten induzierte Bildung einer

Knochenmatrix durch ko-kultivierte Endothelzellen unterstützt werden [Fröhlich et al., 2008; Dariima et al., 2013].

Demnach könnte die Ko-Kultivierung beider Zelltypen mehrere Vorteile bringen: 1) Verbesserung des Zellüberlebens durch eine niedrige Apoptose-Rate, 2) Verbesserung der Proliferation über eine Aktivierung von Signalkaskaden und 3) Verbesserung der Funktion durch verstärkte Knochenmatrixbildung. Entsprechend wiesen lediglich HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroide im Vergleich zur initialen Sphäroidgröße an Tag 0 eine deutliche Zunahme ihrer Größe 14 Tage nach Transplantation auf. Alle anderen Sphäroidgruppen zeichneten sich durch eine konstante Größe im Beobachtungsverlauf aus.

Ein weiterer großer Vorteil von HDMEC-enthaltenen Ko-Kultur-Sphäroiden ist die Ausbildung von tubulären, Gefäß-ähnlichen Netzwerken *in vitro*. Hierzu waren Mono-Kultur-Sphäroide nicht fähig. In vielen Studien konnte ein höheres angiogenes Potential der Endothelzellen in Ko-Kultivierung mit z. B. Osteoblasten im Vergleich zur Mono-Kultur nachgewiesen werden [Grellier et al., 2009a, b]. So konnten z. B. Unger et al. (2007) zeigen, dass HDMEC bei direktem Kontakt und Ko-Kultivierung mit Osteoblasten in der Lage sind, ein prävasculäres Netzwerk mit tubulären, Gefäß-ähnlichen Strukturen auszubilden.

Für eine erfolgreiche Integration eines transplantierten Gewebekonstrukts ist eine ausreichende Vaskularisierung essentiell [Laschke et al., 2008a]. Das Überleben der Zellen innerhalb eines solchen Konstrukts hängt entscheidend von der ausreichenden Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff ab [Kanczler und Oreffo, 2008; Rouwkema et al., 2008]. Da Zellen nur maximal über eine Entfernung von ca. 150-200 µm zu einem Blutgefäß per Diffusion versorgt werden können [Folkman und Hochberg, 1973; Laschke et al., 2008b], ist daher eine schnelle Vaskularisierung die Grundvoraussetzung für das Überleben und die Proliferation der Zellen im Inneren von Sphäroiden, welche einen größeren Durchmesser als 300-400 µm aufweisen.

Eine vielversprechende Vaskularisierungsstrategie im Tissue Engineering ist die Generierung eines präformierten Mikrogefäßsystems in Gewebekonstrukten, welches sich nach Transplantation über Inoskulation mit dem Empfängergefäßsystem verbindet [Laschke et al., 2006; Lokmic und Mitchell, 2008]. Die sogenannte „interne“ Inoskulation zeichnet sich dabei durch das Einwachsen von Mikrogefäßen des Empfängernetzwerkes in das Transplantat aus, wo eine Verbindung beider Netzwerke stattfindet [Laschke et al., 2009]. Gleichzeitig kann eine Regression der transplantierten präformierten Mikrogefäße beobachtet werden [Laschke et al., 2009]. Im Gegensatz hierzu kann eine „externe“ Inoskulation bei hoher angiogener Aktivität des präformierten Gefäßnetzwerkes auch außerhalb des Transplantats beobachtet werden [Laschke et al., 2009; Kuehl et al., 2013].

In der vorliegenden Arbeit ermöglichte die intravitale Fluoreszenzmikroskopie nach Transplantation der Sphäroide in die Rückenhautkammer von CD1 Nu/Nu-Mäusen eine

detaillierte Analyse der Vaskularisierung der Transplantate. Bereits nach drei Tagen waren erste Gefäß-ähnliche Strukturen der Sphäroide mit Erythrozyten gefüllt. Dies zeigt, dass es zu diesem Zeitpunkt zu Verbindungen zwischen dem Mikrogefäßsystem des Empfängergewebes und des präformierten, transplantierten Mikrogefäßsystems gekommen war. Dieses Phänomen wurde als intrinsische Vaskularisierung bezeichnet. Dennoch konnte kein FITC-Dextran positives Plasma während der Mikroskopie detektiert werden.

Die immunhistochemische Analyse CD31-positiver Mikrogefäße innerhalb der Sphäroide ergab, dass die Ko-Kultur-Sphäroide 14 Tage nach Transplantation nur wenige eingewachsene murine Mikrogefäße enthielten, dafür aber ein dichtes, humanes Mikrogefäßnetzwerk ausgehend von HDMEC. Der morphologische Nachweis von intraluminalen Erythrozyten bestätigte die Verbindung von humanen und murinen Gefäßstrukturen [Schechner et al., 2000; Steffens et al., 2009].

Zudem konnten außerhalb der Sphäroide auch Mikrogefäße humanen Ursprungs innerhalb des murinen Empfängergewebes entdeckt werden. Dies zeigt, dass auch eine externe Inoskulation stattfand [Laschke et al., 2009; Kuehl et al., 2013]. Dementsprechend besitzt das Mikrogefäßnetzwerk humanen Ursprungs eine hohe Überlebensrate, hohe Stabilität und hohe angiogene Aktivität [Laschke und Menger, 2012].

Die Bildung neuer Blutgefäße ist ein komplexer Prozess, welcher nicht nur die Aktivierung und das Sprouting von Endothelzellen beinhaltet, sondern auch entscheidend abhängig von anderen Zelltypen, wie z. B. Perizyten, SMC und Fibroblasten, ist [Hetheridge et al., 2011; Nicosia et al., 2011; Ribatti et al., 2011]. Fibroblasten sind eine wichtige Proteinquelle der extrazellulären Matrix und tragen deshalb zur Stabilität der neu-geformten Mikrogefäße bei [Nicosia et al., 2011]. Demzufolge sollte die Ergänzung von NHDF zu HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroiden den Vaskularisierungsprozess verbessern. Dies war aber in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall. Tatsächlich zeigten HOB-HDMEC-NHDF-Ko-Kultur-Sphäroide eine geringere intrinsische Vaskularisierung im Vergleich zu HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroiden. Außerdem konnte eine niedrigere Perfusion und Dichte humaner Gefäße an Tag 14 festgestellt werden. Diese Ergebnisse können durch eine *in vitro* Studie von Wenger et al. [2005] erklärt werden, welche eine geringere Sprouting-Aktivität von Endothelzellen in Ko-Kultur mit Fibroblasten zeigte. Dieser inhibitorische Effekt wird nicht über einen parakrinen Mechanismus ausgelöst, sondern höchstwahrscheinlich über die Bildung von heterogenen Zellkontakten zwischen beiden Zelltypen im Inneren des Sphäroids [Wenger et al., 2005].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroide sich auf Grund ihrer „intrinsischen“ Vaskularisierung und Perfusion bei gleichzeitig geringer Apoptose-Rate als Vaskularisierungseinheiten für das Tissue Engineering von

Knochen eignen. Der zusätzliche Einbau von Fibroblasten in Ko-Kultur-Sphäroide führt zu keinem zusätzlichen Vorteil.

7.3 Schlussfolgerung

Eines der Hauptprobleme beim klinischen Einsatz des Tissue Engineerings von Knochen stellt die fehlende oder unzureichende Vaskularisierung der transplantierten Gewebekonstrukte dar. Mit Hilfe der *in vitro* Generierung von Gefäßnetzwerken durch Ko-Kultur-Sphäroide könnte eine schnellere Blutversorgung der Transplantate ermöglicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vivo* die Vaskularisierung von Mono- und Ko-Kultur-Sphäroiden mit Hilfe des Modells der Rückenhautkammer der Maus und der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass sich HOB-HDMEC-Ko-Kultur-Sphäroide nach Transplantation durch eine schnelle, funktionelle Vaskularisierung auszeichnen, welche durch Verbindungen zwischen dem eigenen intrinsischen Netzwerk und dem Gefäßsystem des Empfängers bei gleichzeitig hoher Viabilität gekennzeichnet ist. Demzufolge könnten diese Ko-Kultur-Sphäroide zukünftig im Tissue Engineering von Knochen als Vaskularisierungseinheiten in Scaffolds oder zur Vitalisierung großer, nicht heilender Knochendefekte eingesetzt werden.

8. Literaturverzeichnis

1. **Achilli TM, Meyer J, Morgan JR.** Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther* 12: 1347-1360, 2012
2. **Agrawal CM, Ray RB.** Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 55: 141-150, 2001
3. **Algire GH.** An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4: 1-11, 1943
4. **Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP.** Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 40: 363-408, 2012
5. **Arvidsson D, Svensson H, Haglund U.** Laser-doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol* 254: 471-476, 1988
6. **Benichou G, Yamada Y, Yun SH, Lin C, Fray M, Tocco G.** Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. *Immunotherapy* 3: 757-770, 2011
7. **Bhang SH, Cho SW, La WG, Lee TJ, Yang HS, Sun AY, Baek SH, Rhie JW, Kim BS.** Angiogenesis in ischemic tissue produced by spheroid grafting of human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* 32: 2734-2747, 2011
8. **Bishop JA, Palanca AA, Bellino MJ, Lowenberg DW.** Assessment of compromised fracture healing. *J Am Acad Orthop Surg* 20: 273-282, 2012
9. **Bonhomme S, Trotteur G, van Damme H, Defraigne JO.** Thrombolysis of occluded infra-inguinal bypass grafts: is it worthwhile? *Acta Chir Belg* 110: 445-450, 2010
10. **Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT.** Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. *Plast Reconstr Surg* 109: 2384-2397, 2002
11. **Brandi MI, Collin-Osdoby P.** Vascular biology and the skeleton. *J Bone Miner Res* 21: 183-192, 2006
12. **Bruder SP, Fox BS.** Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clin Orthop Relat Res* 367: S68-S83, 1999
13. **Carano RA, Filvaroff EH.** Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today* 8: 980-989, 2003

14. **Carletti E, Motta A, Migliaresi C.** Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods Mol Biol* 695: 17-39, 2011
15. **Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395, 2000
16. **Carmeliet P.** Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438: 932-936, 2005
17. **Cenni E, Perut F, Baldini N.** In vitro models for the evaluation of angiogenic potential in bone engineering. *Acta Pharmacol Sin* 32: 21-30, 2011
18. **Clark, ER.** Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammal. *Am J Anat* 64: 251-301, 1939
19. **Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM.** Transmission of hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 77: 214-224, 1995
20. **Darby IA, Hewitson TD.** Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol* 257: 143-179, 2007
21. **Dariima T, Jin GZ, Lee EJ, Wall IB, Kim HW.** Cooperation between osteoblastic cells and endothelial cells enhances their phenotypic responses and improves osteoblast function. *Biotechnol Lett* 35: 1135-1143, 2013
22. **Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CW.** Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 143: 1545-1553, 2002
23. **Donovan D, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE.** Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis* 4:113-121, 2001
24. **Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K.** Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 177: 125-134, 1980
25. **Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J.** The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676, 2003
26. **Flören M, Kappe T, Reichel H.** [Analysis of the effectiveness of an internal hospital bone bank]. *Orthopäde* 36: 667-672, 2007
27. **Folkman J, Hochberg M.** Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 138: 745-753, 1973

-
28. **Friedlaender GE.** Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop Relat Res* 174: 58-68, 1983
 29. **Friedlaender GE, Horowitz MC.** Immune response to osteochondral allografts: nature and significance. *Orthopedics* 15: 1171-1175, 1992
 30. **Fröhlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G.** Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther* 3: 254-264, 2008
 31. **Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E.** Bone substitutes: An update. *Injury* 36 S3: S20-S27, 2005
 32. **Götz W, Reichert C, Canullo L, Jäger A, Heinemann F.** Coupling of osteogenesis and angiogenesis in bone substitute healing – a brief overview. *Ann Anat* 194: 171-173, 2012
 33. **Grellier M, Bordenave L, Amédée J.** Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 27: 562-571, 2009a
 34. **Grellier M, Ferreira-Tojais N, Bourget C, Bareille R, Guillemot F, Amédée J.** Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. *J Cell Biochem* 106: 390-398, 2009b
 35. **Hallfeldt KK, Kessler S, Puhlmann M, Mandelkow H, Schweiberer L.** [The effect of various sterilization produces on the osteoinductive properties of demineralized bone matrix]. *Unfallchirurg* 95: 313-318, 1992
 36. **Hallfeldt KK, Stützle H, Puhlmann M, Kessler S, Schweiberer L.** Sterilization of partially demineralized bone matrix: The effects of different sterilization techniques on osteogenetic properties. *J Surg Res* 59: 614-620, 1995
 37. **Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K.** An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp* 17: 322-327, 1997
 38. **Hauser J, Ring A, Schaffran A, Heinrich L, Esenwein SA, Steinau HU, Stricker I, Langer S.** In vivo analysis of tissue response to plasma-treated collagen-I-coated titanium alloys. *Eur Surg Res* 43: 262-268, 2009
 39. **Herrmann KS.** Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 26: 238-249, 1983

-
40. **Hetheridge C, Mavria G, Mellor H.** Uses of the in vitro endothelial-fibroblast organotypic co-culture assay in angiogenesis research. *Biochem Soc Trans* 39: 1597-1600, 2011
 41. **Hobbs JB, Chusilp S, Hua A, Kincaid-Smith P, McIver MA.** The pathogenesis of hypertensive vascular changes in the rat: microscopic and ultrastructural correlation in vivo. *Clin Sci Mol Med* 3: S73-S75, 1976
 42. **Hollinger JO, Kleinschmidt JC.** The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1: 60-68, 1990
 43. **Holtfreter J.** A study of mechanics of gastrulation: Part II. *J Exp Zool* 95: 171-212, 1944
 44. **Ito H, Kamiya A, Ito K, Yanagida A, Okada K, Nakauchi H.** In vitro expansion and functional recovery of mature hepatocytes from mouse adult liver. *Liver Int* 32: 592-601, 2012
 45. **Ivascu A, Kubbies M.** Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen* 11: 922-932, 2006
 46. **Jadlowiec JA, Celil AB, Hollinger JO.** Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 3: 409-423, 2003
 47. **Kanczler JM, Oreffo RO.** Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 15: 100-114, 2008
 48. **Klingberg F, Hinz B, White ES.** The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol* 229: 298-309, 2013
 49. **Korff T, Augustin HG.** Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143: 1341-1352, 1998
 50. **Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG.** Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J* 15: 447-457, 2001
 51. **Krenning G, van Luyn MJ, Harmsen MC.** Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy. *Trends Mol Med* 15: 180-189, 2009
 52. **Kuehl AR, Abshagen K, Eipel C, Laschke MW, Menger MD, Laue M, Vollmar B.** External inosculation as a feature of revascularization occurs after free transplantation of murine liver grafts. *Am J Transplant* 13: 286-298, 2013

-
53. **Langer R, Vacanti JP.** Tissue Engineering. *Science* 260: 920-926, 1993
 54. **Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rücker M, Junker D, Häufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD.** Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng* 12: 2093-2104, 2006
 55. **Laschke MW, Rücker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD.** Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Ann Surg* 248: 939-948, 2008a
 56. **Laschke MW, Rücker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD.** Incorporation of growth factor containing Matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 85: 397-407, 2008b
 57. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD.** Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Eng Part B Rev* 15: 455-465, 2009
 58. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD.** The dorsal skinfold chamber: Window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mat* 22: 147-164, 2011
 59. **Laschke MW, Menger MD.** Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. *Eur Surg Res* 48: 85-92, 2012
 60. **Laschke MW, Schank TE, Scheuer C, Kleer S, Schuler S, Metzger W, Eglin D, Alini M, Menger MD.** Three-dimensional spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells are potent initiators of blood vessel formation in porous polyurethane scaffolds. *Acta Biomater* 9: 6876-6884, 2013
 61. **Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF.** Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 3: 49-57, 2006
 62. **Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K.** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-1062, 1993
 63. **Lokmic Z, Mitchell GM.** Engineering the microcirculation. *Tissue Eng Part B Rev* 14: 87-103, 2008
 64. **Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K.** Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg* 38: 139-145, 1990

-
65. **Menger MD, Lehr HA.** Scope and perspectives of intravital microscopy-bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14: 519-522, 1993
 66. **Menger MD, Laschke MW, Vollmar B.** Viewing the microcirculation through the window: Some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34: 83-91, 2002
 67. **Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K.** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „reflow paradox“. *Am J Physiol* 263: H1901-H1906, 1992
 68. **Metzger W, Grenner N, Motsch SE, Strehlow R, Pohlemann T, Oberringer M.** Induction of myofibroblastic differentiation in vitro by covalently immobilized transforming growth factor-beta. *Tissue Eng* 12: 2751-2760, 2007
 69. **Metzger W, Schimmelpfennig L, Schwab B, Sossong D, Dorst N, Bubel M, Görg A, Pütz N, Wennemuth G, Pohlemann T, Oberringer M.** Expansion and differentiation of human primary osteoblasts in two- and three-dimensional culture. *Biotech Histochem* 88: 86-102, 2013
 70. **Metzger W, Sossong D, Bächle A, Pütz N, Wennemuth G, Pohlemann T, Oberringer M.** The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy* 13: 1000-1012, 2011
 71. **Murphy SP, Porrett PM, Turka LA.** Innate immunity in transplant tolerance and rejection. *Immunol Rev* 241: 39-48, 2011
 72. **Muschler GF, Midura RJ.** Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res* 395: 66-80, 2002
 73. **Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, Hanada K, Kumegawa M, Hakeda Y.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* 473: 161-164, 2000
 74. **Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D.** Orthopaedic applications of bone graft and graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* 132: 15-30, 2010
 75. **Nemeno-Guanzon JG, Lee S, Berg JR, Jo YH, Yeo JE, Nam BM, Koh YG, Lee JI.** Trends in tissue engineering for blood vessels. *J Biomed Biotechnol*, 2012: 956345, 2012

-
76. **Nicosia RF, Zorzi P, Ligresti G, Morishita A, Aplin AC.** Paracrine regulation of angiogenesis by different cell types in the aorta ring model. *Int J Dev Biol* 55: 447-453, 2011
 77. **Ohara S, Ukita Y, Ninomiya H, Ohno K.** Axonal dystrophy of dorsal root ganglion sensory neurons in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *Exp Neurol* 187: 289-298, 2004
 78. **Oreffo RO.** Growth factors for skeletal reconstruction and fracture repair. *Curr Opin Investig Drugs* 5: 419-423, 2004
 79. **Orr AW, Elzie CA, Kucik DF, Murphy-Ullrich JE.** Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 116: 2917-2927, 2003
 80. **Patan S.** Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 117: 3-32, 2004
 81. **Pries AR.** A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 7: 327-345, 1988
 82. **Pugh CW, Ratcliffe PJ.** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9: 677-684, 2003
 83. **Reed MW, Miller FN.** Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* 36: 104-107, 1988
 84. **Ribatti D, Nico B, Crivellato E.** The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol* 55: 261-268, 2011
 85. **Ring A, Tilkorn DJ, Goertz O, Langer S, Schaffran A, Awakowicz P, Hauser J.** Surface modification by glow discharge gasplasma treatment improves vascularization of allogenic bone implants. *J Orthop Res* 29: 1237-1244, 2011
 86. **Risau W.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997
 87. **Rose FR, Oreffo RO.** Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 1-7, 2002
 88. **Rouwkema J, de Boer J, van Blitterswijk CA.** Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue construct. *Tissue Eng* 12: 2685-2693, 2006
 89. **Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA.** Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 26: 434-441, 2008

-
90. **Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF.** Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45: 505-513, 1997
 91. **Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL.** Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 4: 743-765, 2004
 92. **Sandison JC.** The transparent chamber of the rabbits ear, giving a complete description of improved technic of construction and introduction, and general account of growth and behavior of living cells and tissues as seen with microscope. *Am J Anat* 41: 447-473, 1928
 93. **Santini MT, Rainaldi G.** Three-Dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 67: 148-157, 1999
 94. **Santos MI, Unger RE, Sousa RA, Reis RL, Kirkpatrick CJ.** Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials* 30: 4407-4415, 2009
 95. **Schechner JS, Nath AK, Zheng L, Kluger MS, Hughes CC, Sierra-Honigmann MR, Lorber MI, Tellides G, Kashgarian M, Bothwell AL, Pober JS.** In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9191-9196, 2000
 96. **Schiller PC, D'Ippolito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA.** Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* 28: 362-369, 2001
 97. **Schmitz JP, Hollinger JO.** The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 205: 299-308, 1986
 98. **Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA, Rayfield MA, Rogers MF.** Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ or tissue donor. *N Engl J Med* 326: 726-732, 1992
 99. **Steffens L, Wenger A, Stark GB, Finkenzeller G.** In vivo engineering of a human vasculature for bone tissue engineering applications. *J Cell Mol Med* 13: 3380-3386, 2009
 100. **Steiner D, Lampert F, Stark GB, Finkenzeller G.** Effects of endothelial cells on proliferation and survival of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts. *J Orthop Res* 30: 1682-1689, 2012

-
101. **Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH.** Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9656-9661, 2002
 102. **Tripathi A, Saravanan S, Pattnaik S, Moorthi A, Partridge NC, Selvamurugan N.** Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-cooper-zinc for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 50: 294-299, 2012
 103. **Uchida H, Maruyama T, Nishikawa-Uchida S, Oda H, Miyazaki K, Yamasaki A, Yoshimura Y.** Studies using an in vitro model show evidence of involvement of epithelial-mesenchymal transition of human endometrial epithelial cells in human embryo implantation. *J Biol Chem* 287: 4441-4450, 2012
 104. **Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, Bulnheim U, Rychly J, Kirkpatrick CJ.** Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* 28: 3965-3976, 2007
 105. **Van de Peppel J, van Leeuwen JP.** Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. *Front Physiol* 5: 137, 2014
 106. **Villars F, Bordenave L, Bareille R, Amédée J.** Effect on human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: Role of VEGF? *J Cell Biochem* 79: 672-685, 2000
 107. **Villaschi S, Nicosia RF.** Paracrine interactions between fibroblasts and endothelial cells in a serum-free coculture model. Modulation of angiogenesis and collagen gel contraction. *Lab Invest* 71: 291-299, 1994
 108. **Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K.** Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg* 75: 421-430, 1992
 109. **Vollmar B, Laschke MW, Rohan R, Koenig J, Menger MD.** In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol* 159: 1661-1670, 2001
 110. **Wang JY, Chang CC, Chiang CC, Chen WM, Hung SC.** Silibinin suppresses the maintenance of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting PP2A/AKT/mTOR pathways. *J Cell Biochem* 113: 1733-1743, 2012

-
111. **Wenger A, Kowalewski N, Stahl A, Mehlhorn AT, Schmal H, Stark GB, Finkenzeller G.** Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 181: 80-88, 2005
 112. **Wenger A, Stahl A, Weber H, Finkenzeller G, Augustin HG, Stark GB, Kneser U.** Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 10: 1536-1547, 2004
 113. **Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD.** Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 126: 881-889, 1999
 114. **Zarem HA.** The microcirculatory events within full-thickness skin allografts (homografts) in mice. *Surgery* 66: 392-397, 1969

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger danke ich ganz besonders für die Überlassung des Themas und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten. Außerdem für die Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit, die Unterstützung bei Fragestellungen und das großzügige Bereitstellen der Räumlichkeiten und Gerätschaften.

Herrn PD Dr. med. Matthias W. Laschke und Dr. rer. nat. Wolfgang Metzger möchte ich ganz speziell für die exzellente Betreuung, Geduld und Hilfsbereitschaft danken, ohne die mir das Gelingen meiner Arbeit nicht ermöglicht worden wäre. Außerdem für die Möglichkeit jederzeit Fragen zu stellen und Probleme zu bewältigen, was mir eine sehr große Hilfe war. Vielen herzlichen Dank für die jederzeit offene Türe und die herzliche Begrüßung!

Frau Dr. med. Annick Görg, meiner Betreuerin, danke ich für Ihre Freundschaft, Hilfe, Unterstützung und das Überlassen des Themas.

Frau Daniela Sossong danke ich für die Herstellung der Sphäroide und ihre Spontanität, mit welcher sie mich immer unterstützt hat.

Frau Sandra Schuler möchte ich ganz besonders für die Anfertigung der histologischen Schnitte und deren Färbung danken, die mir immer ordentlich und zeitnah zur Verfügung standen. Außerdem für das Einbetten der Sphäroide für die histologische *in vitro* Aufbereitung.

Frau Christina Marx möchte ich für die *in vivo* Aufbereitung der Sphäroide bedanken.

Frau Dr. med. vet. Monika Frings und Dr. med. vet. Christina Körbel möchte ich für die große Unterstützung während der Tierversuche danken.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für das freundliche Arbeitsklima und die erstklassige Zusammenarbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Marianne Walser, Heinz Walser, Dominik Walser, Thomas Mager und Simon Wespi für ihre allgegenwärtige, geduldige Unterstützung und ihr bedingungsloses Vertrauen in mich und meine Arbeit. Dominik Walser im Speziellen hat mich in meiner Arbeit durch seine exzellenten Computerkenntnisse immer wieder aufs Neue überrascht und unterstützt. Ihm möchte ich vor allem für seine Geduld und Ausdauer danken.

11. Publikationen

11.1 Originalarbeiten

Walser R, Metzger W, Görg A, Pohlemann T, Menger MD, Laschke MW. Generation of co-culture spheroids as vascularization units for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater* 26: 222-233, 2013

11.2 Vorträge/Abstracts

Metzger W, Walser R, Bächle A, Sossong D, Pütz N, Wennemuth G, Laschke MW, Oberringer M, Pohlemann T. Co-culture spheroids as a tool for angiogenic research. *Regenerative Medicine* 6 S2: S120, 2011

World Conference on Regenerative Medicine, Leipzig, Deutschland

Walser R, Görg A, Laschke MW, Metzger W, Pohlemann T, Menger MD. In vivo analysis and vascularization of co-culture spheroids for bone tissue engineering. *Langenbecks Arch Surg* 397: 667, 2012

129. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, Deutschland

Walser R, Görg A, Laschke MW, Metzger W, Pohlemann T, Menger MD. In vivo Analyse der Angiogenese und Vaskularisierung von Ko-Kultur-Sphäroiden für Knochen Tissue Engineering, 2012

20. Wissenschaftliche Jahrestagung der Saarländischen Chirurgenvereinigung e.V., Völklingen, Deutschland. Nominierung für Nachwuchsförderpreis: 2. Platz